



**Sara Filipa Grilo Serrano**

Licenciatura em Ciências Biomédicas

## **Desenvolvimento de um sensor para detecção de triclosano em leite materno**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientadora: Maria de Fátima Guerreiro da Silva Campos Raposo, Professora Associada, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Maria Manuela Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro, 2018**



**Sara Filipa Grilo Serrano**

Licenciatura em Ciências Biomédicas

## **Desenvolvimento de um sensor para detecção de triclosano em leite materno**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientadora: Maria de Fátima Guerreiro da Silva Raposo, Professora Associada,  
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de  
Lisboa

Co-orientadora: Maria Manuela Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e  
Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

**Novembro, 2018**



**Desenvolvimento de um sensor para detecção de triclosano em leite materno**

Copyright © Sara Filipa Grilo Serrano, Faculdade de Ciências e Tecnologia,  
Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor



## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais estou muito grata.

À Professora Maria de Fátima Raposo pela sua orientação, apoio e disponibilidade, pelas opiniões e críticas, colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

À Professora Maria Manuela Pereira pela sua disponibilidade, conhecimento transmitido e por me ter acolhido no seu laboratório, dando-me apoio imprescindível.

Aos meus colegas Gonçalo Barreto e Filipa Pires, pela sua ajuda e colaboração.

À Faculdade de Ciências e Tecnologias.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia – FCT, pelos projectos PTDC/FIS-NAN/0909/2014 e UID/FIS/00068/2013.

Por último, e com a maior importância, quero agradecer à minha irmã Andreia Serrano e ao meu namorado Hugo Martins. Foi com eles que passei todos os momentos desta tese e foi pelo seu incentivo e suporte que ela chegou ao fim. É um privilégio poder partilhar todos os meus dias convosco. Obrigada por serem os meus melhores amigos, a minha irmã desde o início da minha vida e o meu namorado desde o feliz momento em que entrou nela.





## Resumo

O triclosano (TCS) é um agente anti-séptico usado largamente em produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais. No entanto, em estudos com animais, foi provado que a exposição continuada pode levar a uma série de consequências negativas, como disfunção tiroideia, carcinogênese, obstrução da força muscular e resistência a antibióticos. Estudos epidemiológicos têm revelado a presença de TCS em quantidades significativas em fluidos corporais em todas as faixas etárias, como urina, sangue e leite materno. O propósito deste trabalho foi desenvolver um sistema sensorial capaz de detectar moléculas de TCS em baixas concentrações no leite materno, seguindo o conceito de língua electrónica, utilizando filmes finos poliméricos preparados pela técnica de camada-por-camada e por impressão molecular e usando espectroscopia de impedância como método de detecção. Os valores de impedância foram medidos em soluções aquosas de TCS e em emulsões preparadas a partir de fórmula infantil, usada como substituto do leite materno, contendo TCS dissolvido. Verificou-se uma variação significativa dos valores de impedância medidos com a adição e aumento da concentração de TCS nas soluções e emulsões em estudo. Essas diferenças foram mais evidentes em situações de baixa concentração revelando que os métodos usados podem ser considerados na detecção de TCS em leite materno.

**Palavras-chave:** Triclosano, leite materno, língua electrónica, polímeros de impressão molecular, espectroscopia de impedância.



## Abstract

Triclosan (TCS) is an antiseptic agent widely used in pharmaceuticals and personal care products. However, in animal studies, it has been proven that continued exposure may lead to a number of negative consequences, such as impaired thyroid function, carcinogenesis, muscle strength obstruction and resistance to antibiotics. Epidemiological studies have been revealing significant amounts of TCS in body fluids in all human age ranges, such as urine, blood and breast milk. Therefore, the purpose of this work is to develop a sensor system for the detection of low concentration TCS in breast milk, following the concept of electronic tongue by using molecularly imprinted polymer and impedance spectroscopy as method of detection being the obtained data characterized. Impedance values were measured in aqueous solutions of TCS and in emulsions prepared from infant formula, used as a substitute for breast milk, containing dissolved TCS. There was a significant variation of the impedance values measured with the addition and increase of the TCS concentration in the solutions and emulsions under study. These differences were more evident in situations of low concentration, revealing that the methods used can be considered in the detection of CSC in breast milk.

**Keywords:** Triclosan, breast milk, molecularly imprinted polymer impedance spectroscopy



# Conteúdo

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ESTADO DA ARTE.....	5
2.1 EXPOSIÇÃO HUMANA AO TRICLOSANO .....	5
2.2 EFEITOS BIOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO TRICLOSANO .....	9
2.2.1 <i>Doença hepática e carcinogénese</i> .....	9
2.2.1.1 Stress oxidativo.....	9
2.2.1.2 Factores epigenéticos e transição epitélio-mesenquimal .....	10
2.2.1.3 Proliferação celular e fibrogénese.....	10
2.2.1.4 Perturbação da função imunológica .....	11
2.2.2 <i>Perturbação endócrina</i> .....	12
2.2.3 <i>Efeitos neurodegenerativos</i> .....	13
2.3 SENSORES DE TRICLOSANO .....	14
2.4 IMPRESSÃO MOLECULAR.....	15
2.5 POLIMERIZAÇÃO RADICALAR EM CADEIA .....	16
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DOPADAS COM TCS.....	20
3.1.1 <i>Em água</i> .....	20
3.1.2 <i>Em leite</i> .....	20
3.2 LÍNGUA ELECTRÓNICA .....	21
3.2.1 <i>Língua electrónica aplicada à espectroscopia de impedância</i> .....	21

3.2.1.1	Sensores com eléctrodos interdigitados.....	22
3.3	DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS PELA TÉCNICA CAMADA SOBRE CAMADA.....	25
3.3.1.1	Polieletrólitos .....	25
3.3.1.2	Óxido de grafeno (OG) .....	27
3.4	IMPRESSÃO MOLECULAR NUMA SUPERFÍCIE.....	30
3.4.1	<i>Materiais</i> .....	30
3.4.1.1	<i>Methacryloyl amido glutamic acid (MAGA)</i> .....	30
3.4.1.2	<i>Tampão fosfato</i> .....	31
3.4.1.3	<i>Allylmercaptane</i> .....	32
3.4.1.4	<i>N,N'-azobisisobutyronitrile</i> .....	32
3.4.1.5	<i>2-hydroxyethyl methacrylate</i> .....	33
3.4.1.6	<i>Ethylene glycol dimethacrylate</i> .....	33
3.4.2	<i>Metodologia</i> .....	34
3.4.2.1	Polimerização da superfície do sensor.....	34
3.4.2.2	Remoção de TCS da superfície do sensor.....	35
3.5	OUTRAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	35
3.5.1	<i>Espectroscopia de infravermelhos</i> .....	35
3.5.2	<i>Proton NMR Spectrometry</i> .....	36
3.5.3	<i>Carbon-13 NMR Spectrometry</i> .....	36
4.	RESULTADOS .....	39
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA DOS ELÉCTRODOS INTERDIGITADOS SEM CAMADAS SENSORIAIS EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE TCS .....	40
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA DOS ELÉCTRODOS INTERDIGITADOS COM CAMADAS SENSORIAIS BASEADAS EM FILMES LbL EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE TCS.....	44
4.2.1	<i>Sensor com filme PAH/OG</i> .....	44
4.2.2	<i>Sensor com filme PAH/PSS</i> .....	48
4.2.3	<i>Sensor com filme PEI/OG</i> .....	52
4.2.4	<i>Sensor com filme PEI/PSS</i> .....	55
4.2.5	<i>Aplicação de PCA aos dados obtidos com filmes LbL</i> .....	58
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA DOS ELÉCTRODOS INTERDIGITADOS SEM CAMADAS SENSORIAIS EM LEITE DOPADO COM TCS .....	61
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA DOS ELÉCTRODOS INTERDIGITADOS REVESTIDOS PELA TÉCNICA DE IMPRESSÃO MOLECULAR EM LEITE DOPADO COM TCS .....	67
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73

## Lista de Figuras

FIGURA 2.1: MEIOS ATRAVÉS DOS QUAIS O TCS CHEGA AO AMBIENTE E AOS SERES VIVOS[3]6	
FIGURA 2.2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREPARAÇÃO DE UM <i>CHIP</i> SPR POR POLIMERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE, MIPS[1]. AIBN: <i>N,N'</i> -AZOBISISOBUTYRONITRILE, MAGA: <i>METHACRYLOYLAMIDO GLUTAMIC ACID</i> , EGDMA: <i>ETHYLENE GLYCOL</i> <i>DIMETHACRYLATE</i> .....	15
FIGURA 2.3: ESQUEMATIZAÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA[25].....	17
FIGURA 3.1: REPRESENTAÇÃO DIMENSIONAL DE UM SENSOR COM ELÉCTRODOS INTERDIGITADOS DE OURO DEPOSITADOS SOBRE VIDRO[2].....	22
FIGURA 3.2: ESTRUTURA MOLECULAR DO POLIELECTRÓLITO PAH[29] .....	25
FIGURA 3.3: ESTRUTURA MOLECULAR DO POLIELECTRÓLITO PEI[29] .....	26
FIGURA 3.4: ESTRUTURA MOLECULAR DO PSS[30].....	27
FIGURA 3.5: ESTRUTURA MOLECULAR DA MOLÉCULA DE OG[2] .....	28
FIGURA 3.6: ESTRUTURA MOLECULAR DO AM[30].....	32
FIGURA 3.7: REACÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO DO AIBN[36] .....	32
FIGURA 3.8: ESTRUTURA MOLECULAR DO HEMA[30] .....	33
FIGURA 3.9: ESTRUTURA MOLECULAR DO EGDMA[38] .....	33
FIGURA 4.1: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	41
FIGURA 4.2: ESPECTRO DE FASE DA IMPEDÂNCIA ( $^{\circ}$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	41

FIGURA 4.3: ESPECTRO DA IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM ÁGUA DOPADA COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS DE $5.072 \times 10^{-2}$ , $4.029 \times 10^{-2}$ , $2.542 \times 10^5$ E $8.038 \times 10^2$ Hz.....	43
FIGURA 4.4: ESPECTRO DA IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/OG EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	45
FIGURA 4.5: ESPECTRO DE FASE DA IMPEDÂNCIA (°) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/OG EM ÁGUA DOPADA COM TCS.....	46
FIGURA 4.6: ESPECTRO DA IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/OG EM ÁGUA DOPADA COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $6.385 \times 10^5$ , $8.038 \times 10^6$ , $1.012 \times 10^6$ E $1.274 \times 10^6$ Hz.....	47
FIGURA 4.7: ESPECTRO DA CAPACITÂNCIA (F) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	48
FIGURA 4.8: ESPECTRO DA IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	49
FIGURA 4.9: ESPECTRO DE FASE DA IMPEDÂNCIA (°) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS.....	49
FIGURA 4.10: ESPECTRO DA IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $5.072 \times 10^5$ E $4.029 \times 10^5$ Hz .....	51
FIGURA 4.11: ESPECTRO DA CAPACITÂNCIA (F) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PAH/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $10^{-2}$ E $1.012 \times 10^{-2}$ Hz.....	51
FIGURA 4.12: ESPECTRO DA IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PEI/OG EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	53
FIGURA 4.13: ESPECTRO DE FASE DA IMPEDÂNCIA (°) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PEI/OG EM ÁGUA DOPADA COM TCS .....	53
FIGURA 4.14: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PEI/OG EM ÁGUA DOPADA COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $6.385 \times 10^4$ , $8.038 \times 10^3$ , $1.274 \times 10^{-2}$ E $4.029 \times 10^{-1}$ Hz .....	54
FIGURA 4.15 ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) FUNÇÃO EM DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PEI/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS.....	56



FIGURA 4.16: ESPECTRO DE FASE DE IMPEDÂNCIA ( $^{\circ}$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PEI/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS.....	56
FIGURA 4.17: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR REVESTIDO COM FILME PEI/PSS EM ÁGUA DOPADA COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $1.604 \times 10^{-2}$ , $1.274 \times 10^{-2}$ , $1.012 \times 10^{-2}$ E $10^{-2}$ Hz.....	57
FIGURA 4.18: A) REPRESENTAÇÃO DAS COMPONENTES PRINCIPAIS PC1 E PC2 OBTIDAS PELO MÉTODO DE PCA A PARTIR DOS ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA COM O SENSOR DE ELÉCTRODOS REVESTIDOS PELOS FILMES LbL, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE $10^{-18}$ M A $10^{-6}$ M DE TCS, QUE EM CONJUNTO EXPLICAM 97,13% DA VARIÂNCIA TOTAL DOS DADOS. B) REPRESENTAÇÃO DAS COMPONENTES PRINCIPAIS PC1 E PC2 OBTIDAS PELO MÉTODO DE PCA A PARTIR DOS ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA COM O SENSOR DE ELÉCTRODOS REVESTIDOS PELOS FILMES LbL PREPARADOS COM PEI/OG, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE $10^{-18}$ M A $10^{-6}$ M DE TCS, EM QUE A COMPONENTE PRINCIPAL 1 CONTRIBUI COM 99,98% DA VARIÂNCIA TOTAL QUANDO OS DADOS CONSIDERADOS SÃO OBTIDOS COM OS FILMES DE PEI/OG. C) COMPONENTE PRINCIPAL 1 OBTIDA POR PCA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS EM ÁGUA A PARTIR DOS RESULTADOS OBTIDOS EM B). ...	60
FIGURA 4.19: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM LEITE DOPADO COM TCS .....	62
FIGURA 4.20: ESPECTRO DA TANGENTE DO GRAU DE FASE DE IMPEDÂNCIA EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM LEITE DOPADO COM TCS.....	63
FIGURA 4.21: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM LEITE DOPADO COM TCS PARA UMA FREQUÊNCIA DE $2.542 \times 10^7$ Hz.....	64
FIGURA 4.22: ESPECTRO DA TANGENTE DO GRAU DE FASE DE IMPEDÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR SEM REVESTIMENTO EM LEITE DOPADO COM TCS PARA UMA FREQUÊNCIA DE $2.542 \times 10^7$ Hz .....	64
FIGURA 4.23: A) REPRESENTAÇÃO DAS COMPONENTES PRINCIPAIS PC1 E PC2 OBTIDAS PELO MÉTODO DE PCA A PARTIR DOS ESPECTROS DE CAPACITÂNCIA EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA O SENSOR COM OS ELÉCTRODOS SEM NENHUM FILME DEPOSITADO, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE 0 M A $10^{-9}$ M DE TCS, QUE EM CONJUNTO EXPLICAM 99,83% DA VARIÂNCIA TOTAL DOS DADOS. B) COMPONENTE PRINCIPAL 1 OBTIDA POR	

PCA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS EM LEITE. ESTES RESULTADOS FORAM OBTIDOS A PARTIR DOS ESPECTROS DE CAPACITÂNCIA EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA.	66
FIGURA 4.24: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR DE ELÉCTRODOS REVESTIDOS COM MIPs EM LEITE DOPADO COM TCS .....	67
FIGURA 4.25: ESPECTRO DA TANGENTE DO GRAU DE FASE DE IMPEDÂNCIA EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (Hz) OBTIDO COM UM SENSOR DE ELÉCTRODOS REVESTIDOS COM MIPs EM LEITE DOPADO COM TCS .....	68
FIGURA 4.26: ESPECTRO DE IMPEDÂNCIA ( $\Omega$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR DE ELÉCTRODOS REVESTIDOS COM MIPs EM LEITE DOPADO COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $1.274 \times 10^7$ , $1.604 \times 10^7$ , $2.019 \times 10^7$ E $2.542 \times 10^7$ Hz.....	69
FIGURA 4.27: ESPECTRO DA TANGENTE DO GRAU DE FASE DE IMPEDÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TCS (M) OBTIDO COM UM SENSOR DE ELÉCTRODOS REVESTIDOS COM MIPs EM LEITE DOPADO COM TCS PARA AS FREQUÊNCIAS $5.072 \times 10^3$ , $2.019 \times 10^4$ , $1.012 \times 10^5$ E $2.542 \times 10^5$ Hz .....	70

## Lista de Tabelas

TABELA 2.1: MÉTRICA GEOMÉTRICA E PERCENTAGENS DE CONCENTRAÇÕES DE TCS E BPA DETECTADAS EM URINA MATERNA, URINA INFANTIL, LEITE MATERNO, FÓRMULA INFANTIL E MECÓNIO[13] .....	8
--	---



## Lista de Siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIBN	<i>Azobisisobutyronitrile</i>
AM	<i>Allylmercaptane</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i>
Bcl2	Gene anti-apoptótico
Bcl-2	Gene regulador da apoptose
BPA	<i>Bisphenol A</i>
EGDMA	<i>Ethylene glycol dimethacrylate</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
ETAR	Estações de tratamentos de águas residuais
H460	Células de cancro do pulmão humano
HEMA	<i>Hydroxyethyl methacrylate</i>

HepG2	Células epiteliais de carcinoma do fígado humano
Il-6	Interleucina que actua como citosina pró-inflamatória e como miosina anti-inflamatória
IS	<i>Impedance Spectroscopy</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LbL	<i>Layer by Layer</i>
LDD	Limite de detecção
LE	Língua electrónica
MAGA	<i>Methacryloyl amido glutamic acid</i>
MCF-7	Células de cancro da mama humano
MIPs	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OG	Óxido de grafeno
p21	Proteína reguladora da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular
p38	Proteínas quinases activadas por mitógeno
PAH	<i>Poly (allylamine hydrochloride)</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PEI	<i>Polyethyleneimine</i>
PKB	Proteína quinase B
PSS	<i>Polystyrenesulfonate</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reactivas ao oxigénio
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>

TCS	Triclosano
Tnf- $\alpha$	Factor de necrose tumoral- $\alpha$
UV	Ultra-violeta

## Introdução

O 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol ou triclosano (TCS), é utilizado como agente antibacteriano e como conservante em produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, tais como medicamentos, pastas dentífricas, desodorizantes, sabonetes, cremes, entre outros[1]. Este composto foi produzido pela primeira vez na década de 60, pela empresa *Ciba-Geigy*, tendo sido introduzido ao consumidor em 1972 na área da saúde e posteriormente expandindo-se para outras áreas. O TCS é um composto aromático, com grupos funcionais fenóis ( $OH$ ) e éteres ( $R - O - R'$ ), com a aparência de um pó branco sólido, pouco solúvel em água, mas solúvel em etanol e metanol. O TCS, ao atingir a membrana citoplasmática pode afectar a síntese de ácido ribonucleico (RNA), responsável pela síntese de proteínas da célula. A actividade antibacteriana do TCS deve-se à sua ligação com a enzima Enocarril-acila transportadora redutase, responsável pela síntese de ácidos gordos, essenciais para manter os níveis saudáveis de lípidos no sangue[2].

Devido às suas propriedades químicas de bioacumulação e resistência à degradação, por causa da sua natureza aromática e alto teor de cloro, estudos epidemiológicos revelam que níveis significativos de TCS podem ser detectados em fluidos corporais em todos os grupos etários humanos, como urina, sangue e leite materno[3]. Vários estudos revelam que mulheres grávidas e os seus fetos são especialmente vulneráveis a alterações hormonais potenciadas pelo TCS, podendo este ser detectado no leite materno em concentrações que variaram de 100 a 2100  $\mu g/kg$  de lípidos[4]. Woods *et al*[5] tomaram consciência de que o TCS



pode pôr em perigo a gravidez, reduzindo a secreção total de estrogénio placentário e reduzindo assim a acção do estrogénio nos tecidos alvo críticos para a manutenção da gravidez. Em ratos injectados com células tumorais do cancro da mama humano, a exposição a TCS exibiu actividade estrogénica e androgénica nas células tumorais, levando a um aumento significativo no desenvolvimento de massas tumorais[6].

Embora o TCS não seja agudamente tóxico para os seres humanos, já foi provado em estudos *in vitro* e *in vivo* em animais que a exposição continuada pode conduzir a uma série de consequências negativas, como função tiroideia prejudicada, perturbação endócrina, *stress* oxidativo que esgota os teores de tiol celular, levando à perturbação da homeostase celular, carcinogénese hepática, obstrução da força muscular e resistência a antibióticos[4]. Desta forma, a inocuidade do uso generalizado e incessante de TCS em produtos de consumo doméstico começa a ser bastante questionável. Em vista destes resultados, várias tentativas têm sido realizadas para desenvolver sensores para detectar este poluente [7][8], mas o maior desafio, a detecção de TCS numa matriz complexa aquosa ou numa emulsão por meio de um sensor eficaz, económico e descartável, para que possa ser utilizado a larga escala, ainda não foi superado.

Tendo em vista um melhor conhecimento acerca dos meios através dos quais o TCS chega até ao ambiente e aos organismos vivos, nomeadamente aos seres humanos, e qual o impacto deste poluente na saúde pública, o objectivo deste projecto consiste no desenvolvimento de um sistema de sensores para a detecção de TCS em baixas concentrações, em leite materno, seguindo o conceito de língua electrónica[9]. Os sensores são preparados a partir de filmes finos obtidos pela técnica camada por camada e por impressão molecular, usando como método de análise a espectroscopia de impedância e caracterização pelo método de análise de componentes principais.

Para além deste capítulo de introdução, esta tese é composta por mais 3 capítulos. No capítulo 2, apresenta-se uma breve introdução ao triclosano e os impactos provocados pela sua utilização e disseminação no ambiente. No capítulo 3 é detalhado todo o procedimento experimental usado, incluídos todos os materiais e metodologias aplicadas. No capítulo 4 são expostos e discutidos os

resultados obtidos. Por fim, no capítulo 5, são apresentadas as conclusões retiradas bem como são indicadas algumas sugestões para trabalhos futuros.

O trabalho em causa consiste na continuação de trabalhos desenvolvidos no passado, trazendo como inovação a preparação de amostras usando leite materno e o revestimento da superfície dos sensores através de técnicas de impressão molecular.



## Estado da Arte

### 2.1 Exposição humana ao triclosano

O TCS chega até nós, por absorção da pele e ingestão, não só através de produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, que usamos diariamente, mas também através da água que bebemos e de todos os alimentos que ingerimos. As estações de tratamentos de águas residuais (ETAR) actuam no sentido de tratar a água de forma a que a mesma seja introduzida num curso de água sem restrições. Contudo, os tratamentos convencionais podem ser insuficientes e ineficazes para alguns compostos, potencialmente perigosos, com consequências nos organismos vivos, incluindo o ser humano. Os produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, cujo consumo se dá à escala global, requerem especial atenção pela sua introdução incessante e consequências no ambiente. Estes produtos têm a capacidade de persistir no ambiente e nos seres vivos com efeitos nocivos. Um dos exemplos mais comuns é o TCS. Durante o processo de tratamento de águas residuais, o TCS é transformado em metiltriclosano, cuja lipofilicidade e resistência a processos de biodegradação e de fotólise fazem com que este metabolito exiba maior grau de persistência no meio ambiente do que o TCS[2]. A fotodegradação do TCS em soluções aquosas pode produzir dioxinas e clorofenóis e, em água ou em vários produtos de consumo, também pode reagir com cloro ou cloramina livres para produzir clorofórmio e outros derivados[8].

A Figura 2.1 ilustra o destino e os efeitos do TCS no ambiente e potenciais formas de exposição humana ao TCS.

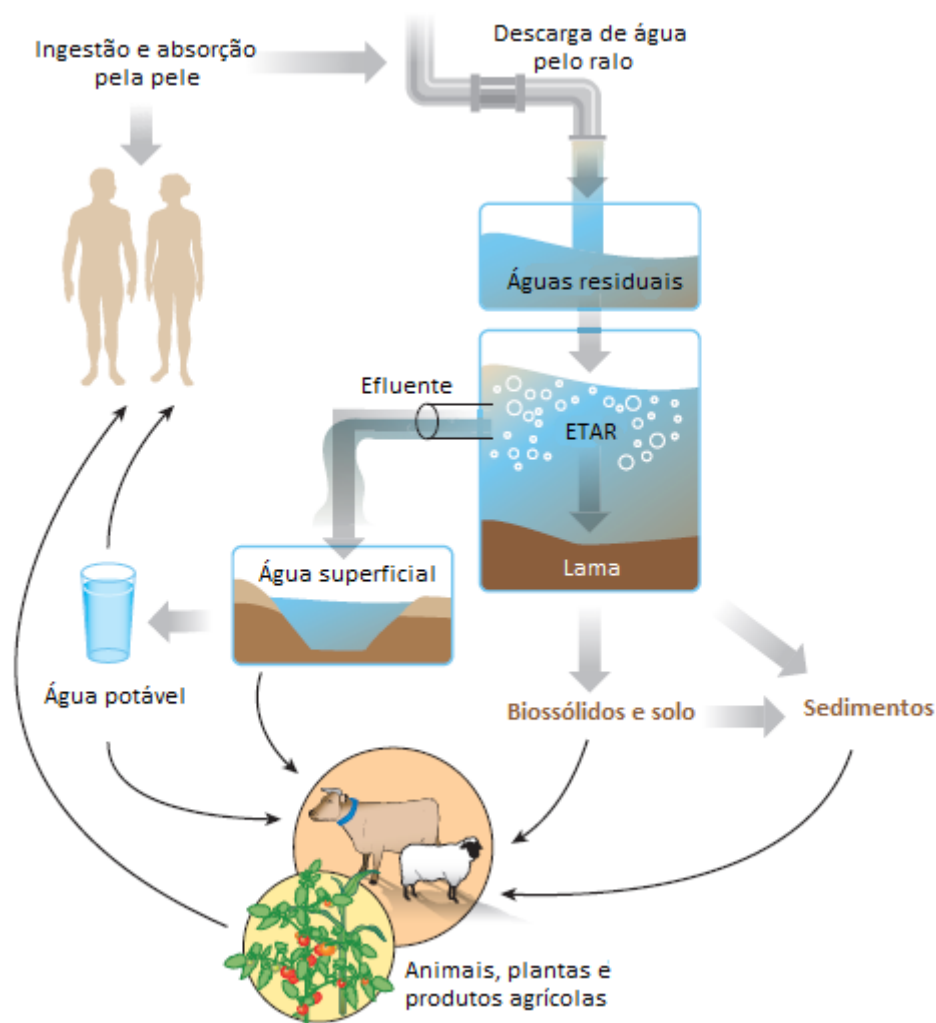


Figura 2.1: Meios através dos quais o TCS chega ao ambiente e aos seres vivos[3]

Numerosos estudos [10][11][12] documentaram a detecção de TCS na urina, sangue e leite materno em diferentes regiões do mundo, sugerindo que a população em geral está exposta ao TCS. O primeiro relato de TCS no leite materno humano foi efectuado num estudo sueco em que em 34 amostras de leite materno o TCS foi detectado em 3 de cada 5 amostras. No Estados Unidos, em 62 amostras de leite foi detectado TCS em 51 das amostras, com valores acima de 150 ng/kg nalgumas das amostras[3]. Rotroff *et al.* estabeleceram um modelo de extrapolação *in vitro* e *in vivo* para estimar a dose oral diária humana (dose equivalente oral) de uma série de produtos químicos, incluindo TCS. Estes

apresentaram um nível de exposição oral humano de 0,13 mg/kg/dia. Estes dados desafiam a utilização segura de TCS em seres humanos e suportam o conceito de que o nível de exposição a TCS humano está dentro do intervalo no qual ocorre uma bioactividade *in vitro* significativa[4].

Centros de controlo e prevenção de doenças, provaram a elevada exposição de certos produtos químicos, tais como fenóis, como TCS, e parabenos, entre a população, em geral, dos EUA. Como estas substâncias químicas são particularmente encontradas em cosméticos, filtros de radiação UV, sabonetes antimicrobianos, loções e plásticos usados em brinquedos e armazenamento de alimentos, conjectura-se que mulheres grávidas e crianças possam estar sujeitas a maior exposição, devido ao uso intensivo destes produtos.

Noutro estudo, num conjunto de 80 mulheres, foram colectadas várias amostras de urina durante a gravidez e após o parto, bem como amostras de urina dos respectivos recém-nascidos e leite materno. Foi detectado TCS em mais de 80% das urinas maternas (com uma média de 21,61 µg/L), em 60% das urinas infantis (com uma média de 2,8 µg/L) e em 46% do leite materno[13]. Mais uma vez, a ampla exposição a fenóis ambientais, como TCS, entre mulheres grávidas e lactentes contribuem para a hipótese de que este grupo populacional está especialmente susceptível aos possíveis riscos associados ao TCS. Na Tabela 2.1, adaptada da literatura, estão representadas as concentrações de TCS e *bisphenol A* (BPA) detectadas em urina materna, urina infantil, leite materno, fórmula infantil (leite artificial) e mecónio (primeira matéria fecal do recém-nascido).

**Tabela 2.1: Média geométrica e percentagens de concentrações de TCS e BPA detectadas em urina materna, urina infantil, leite materno, fórmula infantil e mecónio**<sup>[13]</sup>

Matriz	MG (95% IQ)	10°	50°	90°	95°	Máx.	Nº	%<LDD
<b>TCS</b>								
Urina materna (µg/L)	21,6 (18,17 25,71)	<LDD	25,3 (21,2 29,6)	523,2 (471,3 591,7)	833,4 (740,7 918,1)	3229,3	1247	16,4
GE-ajustada	22,9 (19,2 27,2)	<LDD	23,3 (20,7 26,8)	526,4 (466,2 576,2)	774,9 (673,6 880,8)	2452,4	1247	13,2
Urina infantil (µg/L)	2,8 (1,6 4,9) 2,5	<LDD	3,9 (3,1 5,1)	21,5 (14,9 61,0)	52,0 (22,7 100,0)	99,9	100	39,0
GE-ajustada	2,5 (1,5 4,4)	<LDD	6,1 (4,8 8,5)	35,3 (16,9 53,4)	53,4 (35,2 229,8)	229,8	98	24,0
Fórmula infantil (µg/L)	<LDD	<LDD	<LDD	1,0 (0,9 3,8)	1,1 (1,0 3,8)	3,8	23	78,3
Leite materno (µg/L)	0,05 (0,01 0,2)	<LDD	<LDD	3,6 (1,7 16,0)	8,8 (3,3 75,4)	75,4	56	53,6
Peso fresco (ng/g)	0,05	<LDD	0,45	3,52	8,51	73,18	56	56,3%
Lípidos (ng/g lípidos)	2,5	<LDD	19,2	95,2	156,0	2287,0	52	56,3%
Mecónio (ng/g)	2,24 (0,97 5,2)	<LDD	3,2 (1,3 12,2)	36,5 (24,6 77,0)	68,8 (30,9 77,0)	77,0	52	19,2
<b>BPA Total</b>								
Urina materna (µg/L)	1,1 (1,0 1,2)	0,3	1,2	4,0	6,4	297,8	1238	8
GE-ajustada	1,2 (1,1 1,3)	0,3	1,3	3,7	5,6	191,4	1238	4
Urina infantil (µg/L)	<LDD	<LDD	0,2	2,3	3,4	9,4	100	60
GE-ajustada	<LDD	<LDD	0,2	1,4	3,4	12,3	100	61
Fórmula infantil (µg/L)	<LDD	<LDD	<LDD	1,2	1,5	9,0	23	70
Leite materno (µg/L)	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	0,4	1,9	56	95
Mecónio (ng/g)	0,52 (0,39 0,69)	<LDD	0,60	1,65	2,65	3,93	54	46
<b>BPA Livre</b>								
Urina infantil (µg/L)	<LDD	<LDD	<LDD	0,2	0,6	9,2	100	89
GE-ajustada	<LDD	<LDD	<LDD	0,2	0,4	12,0	100	89
Leite materno (µg/L)	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	1,6	23	96
Fórmula infantil (µg/L)	<LDD	<LDD	<LDD	1,0	1,6	9,0	56	74

LDD: limite de detecção, MG: média geométrica, IQ: ionização química, GE: gravidade específica. LDDs na urina: BPA livre: 0,1; BPA total: 0,2; TCS: 3,0 µg/L. LDDs no leite materno/fórmula infantil: BPA livre: 0,30; TCS: 0,58 µg/L. LDDs em mecónio: BPA total: 0,48; TCS: 0,49 ng/g.

## 2.2 Efeitos biológicos e fisiológicos do triclosano

### 2.2.1 Doença hepática e carcinogénese

Em estudos de carcinogénese crónica em ratos foram encontrados no fígado tumores relacionados ao tratamento com TCS, com sinais de hipertrofia e vacuolização dos hepatócitos. Conjectura-se que em água da torneira tratada com cloro, o TCS aumenta a produção de clorofórmio, que a *Environmental Protection Agency* (EPA) classifica como provável carcinógeno humano. Foi também sugerida uma ligação de TCS a dioxinas, uma família de compostos com amplas toxicidades, incluindo carcinogénese e enfraquecimento do sistema imunitário e da função reprodutiva[4]. Ma *et al.* [14] demonstraram que o TCS reduz significativamente o nível de metilação do ácido desoxirribonucleico (ADN) global em células humanas HepG2 (células epiteliais de carcinoma do fígado humano) e inibiu a actividade da metiltransferase do ADN, implicando que o TCS pode promover o desenvolvimento de tumores alterando a metilação do ADN, já que a hipometilação global do ADN é considerada um biomarcador de progressão do cancro. Através de experiências *in vivo* e *in vitro* com uma variedade de biomarcadores, demonstrou-se que o TCS aumenta a proliferação de hepatócitos, induz fibrogénese, produz *stress* oxidativo e promove respostas inflamatórias[4].

#### 2.2.1.1 Stress oxidativo

Em fígados de ratos tratados com TCS foram encontrados níveis aumentados de superóxido, exibindo um aumento acentuado na expressão de genes responsivos ao *stress* oxidativo [4].

Em ensaios de estabilidade da membrana lisossomal, Binelli *et al.* [15] demonstraram a existência de graves lesões de ADN induzidas por TCS em hemócitos de mexilhão, relacionadas com a presença de espécies reactivas de



oxigênio e ao *stress* oxidativo. Os autores indicaram que a toxicidade do TCS associada ao *stress* oxidativo foi atribuída, pelo menos parcialmente, à produção de 2,4-diclorofenol, um subproduto clorado de TCS.

Estudos em minhocas (*Eisenia fetida*) e caracóis (*Achatina fulica*) mostraram que os efeitos adversos do TCS sobre esses organismos estão associados ao *stress* oxidativo, como evidenciado pela indução de genes responsivos ao *stress* oxidativo e aumento do teor de malondialdeído[4].

### **2.2.1.2 Factores epigenéticos e transição epitélio-mesenquimal**

Utilizando células de cancro do pulmão humano, H460, Winitthana *et al.* [16] descobriram que a exposição ao TCS predispõe essas células a sofrer transição epitélio-mesenquimal, manifestando o fenótipo mesenquimal. Quando as células tumorais foram tratadas com TCS, a concentrações fisiologicamente relevantes, estas exibiram uma diminuição da adesão célula por célula e níveis aumentados de biomarcadores associados à transição epitélio-mesenquimal, implicando que o TCS pode promover a transição epitélio-mesenquimal e aumentar a migração de células tumorais, invasão, sobrevivência e capacidade de metastização.

### **2.2.1.3 Proliferação celular e fibrogénese**

Em ratos, após 8 meses de exposição ao TCS, numa dose de 800 ppm diárias introduzidas na dieta, foi constatado que estes apresentavam um aumento do peso do fígado em relação ao peso corporal, acompanhado de expressão elevada de marcadores de genes associados à síntese de ADN e proliferação celular. A resposta proliferativa induzida pelo TCS foi associada ao aumento da expressão de genes fibrogénicos, Colágeno 1a1, actina- $\alpha$  do músculo liso e inibidores teciduais de metaloproteinases, bem como níveis elevados de apoptose[17]. Estes resultados sugerem que o TCS causa danos hepáticos

crónicos e apoptose dos hepatócitos e os hepatócitos sobreviventes sofrem proliferação compensatória e fibrogénese[4].

Em ratos tratados com células de cancro da mama humano, MCF-7, a exposição a TCS pareceu desencadear o crescimento destas células, levando a um aumento significativo no desenvolvimento de massas tumorais. A proliferação de células MCF-7 após o tratamento com TCS foi acompanhada por expressão aumentada de Ciclina D1 (proteína reguladora do ciclo celular) e diminuição de p21 (proteína reguladora da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular), sugerindo que a exposição ao TCS está associada ao controlo da transição de G1 para S do ciclo celular durante a proliferação de células cancerosas[18].

#### **2.2.1.4 Perturbação da função imunológica**

Foi reconhecido um aumento na inflamação do fígado demonstrado pelos níveis de expressão significativamente mais elevados das citocinas pró-inflamatórias, factor de necrose tumoral- $\alpha$  (Tnf- $\alpha$ ) e Il-6 (interleucina que actua como citosina pró-inflamatória e como miosina anti-inflamatória), em experiências de exposição ao TCS através da alimentação[17].

Na literatura[19] encontram-se, também, estudos acerca dos efeitos do TCS sobre as concentrações intracelulares de zinco (Zn), uma vez que este desempenha um papel crítico na função imunológica adequada. Foi comprovada a correlação entre níveis elevados de Zn intracelular, após tratamento com TCS, e níveis diminuídos do conteúdo de tiol em timócitos de ratos. Os resultados sugerem que o TCS a uma dose de 1-3  $\mu$ M produziu *stress* oxidativo que esgota os teores de tiol celular, levando à perturbação da homeostase celular de  $Zn^{2+}$ .

Em ensaios[4] utilizando células *natural killer* (NK) humanas *in vitro* foi comprovado que o TCS, a concentrações tão baixas como 1  $\mu$ M e com exposição prolongada (6 dias), diminuiu a capacidade das células NK na lise de células tumorais, função essencial para a inibição de células infectadas e células tumorais.

Embora em muitos destes estudos tenham sido usadas concentrações de TCS mais elevadas do que as previstas para a exposição humana, estes fornecem fortes evidências de potenciais efeitos produzidos pelo TCS – *stress* oxidativo, proliferação celular e fibrogénese, modificação epigenética e perturbação do sistema imunitário – através dos quais o TCS exerce o seu efeito de patogénese e carcinogénese.

### 2.2.2 Perturbação endócrina

O potencial do TCS para agir como disruptor endócrino foi examinado em diferentes organismos e vários estudos têm provado a sua toxicidade reprodutiva e perturbação endócrina em animais, tanto *in vitro* como *in vivo*. O TCS tem demonstrado possuir efeitos androgénicos fracos em peixes e efeitos antiandrogénicos em ratos. Ensaio *in vitro*, utilizando células do cancro da mama humano, revelaram que o TCS possuía actividades antiestrogénicas e antiandrogénicas através da interacção com ER $\alpha$ , com Er $\beta$  (receptores nucleares de estrogénio) e com receptores de androgénio[6]. Agindo como antagonista, o TCS inibe a actividade destes receptores quando administrados concomitantemente com os seus ligandos endógenos[20].

Em estudos de análise sobre os efeitos do TCS sobre a secreção placentária de progesterona, estradiol e  $\beta$ -hCG (hormonas produzidas pela placenta), em células derivadas de coriocarcinoma gestacional humano, o TCS alterou a produção destas hormonas, estimulando a secreção de estradiol e progesterona e reduzindo a secreção de  $\beta$ -hCG[4], provando a existência de perturbações endócrinas na placenta.

Em doses elevadas, em ratos machos, verificou-se que o TCS diminui a testosterona sérica, embora sem efeitos na puberdade (separação prepucial) ou no peso do órgão reprodutor[3].

A exposição materna pré-natal de TCS, em ratos, resultou em hipotiroxinemia. Durante 31 dias de exposição a TCS, verificou-se uma

diminuição significativa de tiroxina (também chamada de tetraiodotironina, T4) de 30 mg/kg/dia. A redução da tiroxina quer nas progenitoras quer nos recém-nascidos demonstra que ambos, durante o desenvolvimento pós-natal, estão susceptíveis à hipotiroxinemia induzida por TCS[21]. A magnitude da hipotiroxinemia observada é consistente com relatos anteriores de diminuição da T4 sérica em ratos jovens e desmamados[22].

### 2.2.3 Efeitos neurodegenerativos

Park *et al.*[23] investigaram os efeitos do TCS na sobrevivência de células estaminais neuronais de ratos. Células corticais de embriões de ratos foram isoladas e cultivadas *in vitro*, sendo introduzido TCS nas células com concentrações entre 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Ao serem medidos os parâmetros de viabilidade celular verificou-se que o TCS diminuiu a viabilidade celular das células estaminais neuronais, de forma dependente da concentração de TCS aplicada, aumentando a expressão de marcadores apoptóticos (marcadores de apoptose), caspase-3 clivada (cisteína peptidase relacionada com a apoptose) e proteína X associada a Bcl-2 (gene regulador de apoptose) e diminuindo a expressão de Bcl2 (gene anti-apoptótico). Constatou-se que o TCS a 50  $\mu$ M induziu a activação de p38 (cinases activadas por citosinas inflamatórias, desempenhando um papel importante na activação de resposta imunitária) como de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*, proteína reguladora do processo de auto-destruição celular), o que pode afectar gravemente a sobrevivência celular. Por outro lado, as actividades de ERK (quinases reguladas por sinal extracelular), PKB (proteína quinase B, desempenha um papel fundamental em múltiplos processos celulares, apoptose, proliferação celular, transcrição e migração celular) e PI3K (fosfoinositídeo 3-quinase, enzima envolvida na sobrevivência celular), que estão correlacionadas de forma positiva com a sobrevivência celular, foram inibidas. Além disso, o TCS a esta concentração aumentou a criação de ROS (espécies reactivas ao oxigénio) nas células estaminais neuronais e esgotou a actividade de glutatona (antioxidante hidrossolúvel). Estes resultados sugerem que o TCS

pode induzir efeitos neurodegenerativos no desenvolvimento do cérebro através de mecanismos de activação de ROS e de apoptose.

## 2.3 Sensores de triclosano

Nos últimos anos, vários sensores têm vindo a ser desenvolvidos para determinação selectiva, sensível e rápida de iões metálicos, compostos tóxicos, biomoléculas e drogas. Para a detecção de TCS, têm sido desenvolvidas técnicas, através de métodos electroquímicos, cromatografia líquida ou gasosa e métodos de luminescência[2]. Yang *et al.*[8] desenvolveram também um sensor electroquímico baseado numa película de múltiplas paredes de nanotubos de carbono para a detecção rápida de TCS em diferentes amostras de pasta de dentes, usando cromatografia líquida de alta eficiência, conseguindo um limite de detecção de 16,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Outro exemplo de sensores de TCS são os biossensores de ressonância de plasmão de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) de impressão molecular utilizando moléculas complexas, com monómeros funcionais. Devido à sua simplicidade e alta sensibilidade, estes sensores têm atraído grande interesse. A técnica de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs) tem variadas aplicações, como em processos de biosseparação, em desintoxicação por afinidade, em dispositivos sensoriais e em separação de compostos sólidos dissolvidos numa mistura líquida[1], capazes de detectar uma grande variedade de moléculas, incluindo aminoácidos, micotoxinas, bases de nucleótidos, pesticidas, produtos farmacêuticos, proteínas e vitaminas[7]. Na Figura 2.2 está representada a preparação de um *chip* para detecção de TCS por SPR usando o método de impressão molecular, sendo este o esquema usado na preparação do sensor para a detecção de TCS em leite materno. A vantagem do sensor desenvolvido neste trabalho em relação aos já existentes assenta no facto de este ser muito mais económico, simples e descartável.

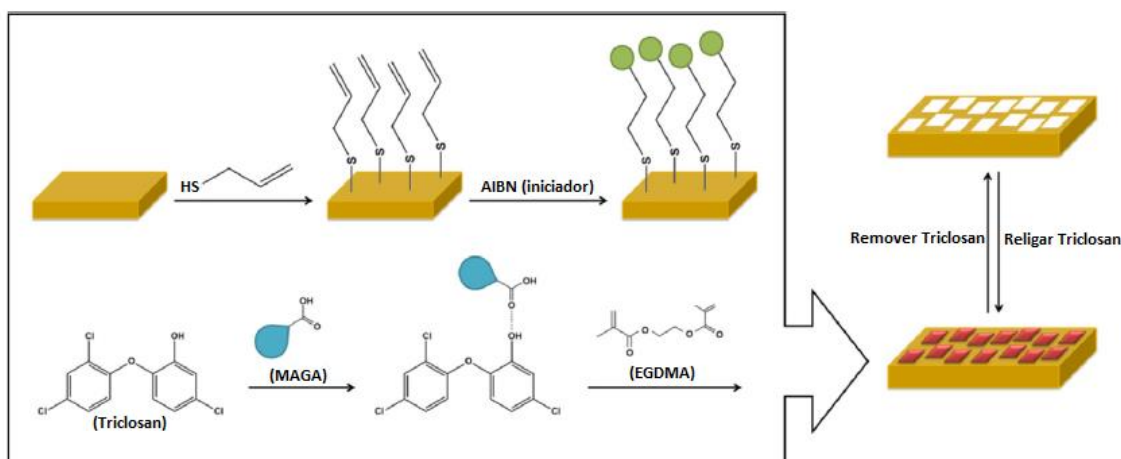


Figura 2.2: Representação esquemática da preparação de um *chip* SPR por polimerização de superfície, MIPs[1]. AIBN: *N,N'*-azobisisobutyronitrile, MAGA: *methacryloylamido glutamic acid*, EGDMA: *ethylene glycol dimethacrylate*

## 2.4 Impressão molecular

A tecnologia de impressão molecular é bastante promissora para a criação de cavidades de bio reconhecimento estáveis, altamente específicas, sensíveis e de longo prazo nas superfícies de um biossensor, permitindo a detecção de um analito em emulsões, como por exemplo, detecção de TCS em leite materno. Os polímeros com impressão molecular são preparados por co-polimerização de monómeros de reticulação com um complexo que é pré-formado entre a molécula molde e os monómeros funcionais utilizando interações covalentes, não covalentes ou semi-covalentes. Quando a molécula molde é removida do material impresso, após a polimerização, deixa cavidades específicas que correspondem a um molde da sua forma. Para além dos biossensores, os MIPs têm sido utilizados com sucesso em muitas aplicações, incluindo purificação, isolamento, separação quiral e catálise. Para a impressão de moléculas em superfícies de biossensor, existem diferentes tipos de técnicas de impressão molecular que podem ser classificados em três categorias principais: impressão

em massa, impressão de superfícies e impressão de epítomos.[24] Neste trabalho será usada impressão de superfícies.

Em impressão superficial, são formados, na superfície de um substrato, locais de reconhecimento de alta afinidade. Devido a isto os locais de reconhecimento são facilmente acessíveis com cinética de ligação favorável. Esta técnica é usada especialmente para a impressão de biomoléculas incluindo proteínas. Na impressão superficial são usadas menos moléculas de molde em comparação com as que são usadas noutras técnicas de impressão. A principal desvantagem deste método na concepção de um sensor é a possibilidade de uma sensibilidade mais baixa em comparação com a impressão em massa, por exemplo, devido ao número reduzido de locais impressos[24].

## 2.5 Polimerização radicalar em cadeia

A polimerização em cadeia é iniciada por uma espécie reactiva  $R^*$  produzida a partir dum composto,  $I$ , denominado de iniciador:  $I \rightarrow R^*$

A espécie reactiva, que pode ser um radical livre, um catião ou um anião, adiciona-se a uma molécula do monómero abrindo uma ligação-p que irá formar um novo radical, catião ou centro aniónico, conforme o caso. O processo é repetido, já que outras moléculas do monómeros são adicionadas sucessivamente para propagar continuamente o centro reactivo:

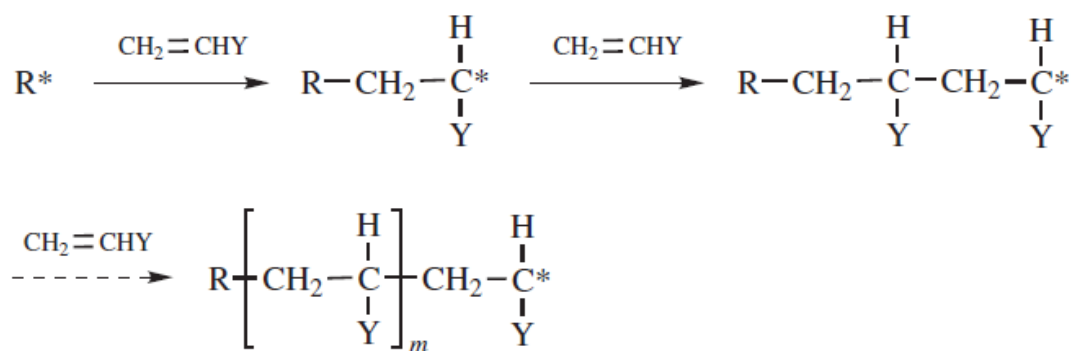


Figura 2.3 Esquematização da polimerização em cadeia[25]

O crescimento do polímero termina num determinado ponto pela destruição do centro reactivo desencadeada por uma certa reacção, dependendo do tipo do centro reactivo e das condições da reacção. Um centro reactivo radical uma vez produzido, adiciona muitas unidades do monómero numa reacção em cadeia e cresce rapidamente para um polímero.

A reacção que faz com que determinado monómero possa ser convertido em polímero depende de considerações tanto termodinâmicas como cinéticas. A polimerização será impossível em todas e quaisquer condições de reacção se não passar no teste de viabilidade termodinâmica. A polimerização só é possível se a diferença de energia livre entre o monómero e o polímero for negativa. A capacidade de realizar uma polimerização termodinamicamente viável depende de sua viabilidade cinética - se o processo prossegue a uma taxa razoável sob um conjunto proposto de condições da reacção. Assim, enquanto que a polimerização dum grande variedade de monómeros insaturados é termodinamicamente viável, muitas vezes são necessárias condições de reacção específicas para obter a viabilidade cinética para realizar uma polimerização particular. Embora os iniciadores radicais, catiónicos e aniónicos sejam usados em polimerizações em cadeia, não podem ser usados indiscriminadamente, já que os três tipos de iniciação não funcionam para todos os monómeros. Os monómeros mostram diferentes graus de selectividade em relação ao tipo de centro reactivo que causará a sua polimerização. A maioria dos monómeros sofre polimerização com um iniciador radical, embora a taxas variáveis. No entanto, os monómeros mostram alta selectividade em relação aos iniciadores iónicos. A



ligação dupla de carbono-carbono em monómeros de vinilo e a ligação dupla de carbono-oxigênio em aldeídos e cetonas são os dois tipos principais de ligações que sofrem polimerização em cadeia.[25]

## Procedimento Experimental

Para o desenvolvimento do sistema de detecção de TCS será utilizada a seguinte metodologia:

a) Preparação de nanoestruturas sensoriais baseadas em filmes ultra-finos por deposição de camadas sequenciais obtidas pela técnica Camada sobre Camada (*Layer by Layer*, LbL) utilizando polielectrólitos em eléctrodos interdigitados. A técnica LbL consiste na obtenção de nanoestruturas por adsorção alternada de macromoléculas de carga eléctrica oposta a partir de solução aquosa sobre um substrato sólido, tendo como vantagem a possibilidade de permitir obter num mesmo filme diferentes moléculas, o controlo preciso da espessura e ser independente da forma da molécula e do tipo do substrato[9].

b) Criação de locais de reconhecimento molecular nas nanosestruturas sensoriais pela técnica de impressão molecular. Esses locais de reconhecimento, criados em matrizes poliméricas, são como moldes complementares ao tamanho, forma e disposição espacial dos grupos funcionais das moléculas a imprimir[24].

c) Caracterização da condutividade dos sensores via espectroscopia de impedância electrónica na interface sólido/líquido em diferentes frequências das nanoestruturas obtidas quando imersas em soluções aquosas e leite materno, ambos com diferentes concentrações de TCS.

d) Utilizar técnicas de Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) já aplicadas com sucesso em língua electrónica para a classificação e quantificação dos componentes da solução e da emulsão[26].

## **3.1 Preparação das amostras dopadas com TCS**

### **3.1.1 Em água**

Inicialmente foi produzida uma solução mãe de TCS de concentração  $10^{-4}$  M, onde 0,00288 g de TCS foram dissolvidos em 100 mL de metanol. Da solução mãe foram retirados 5  $\mu$ L que foram adicionados a 5 mL de metanol, perfazendo uma nova solução de concentração  $10^{-7}$  M. Novamente, da solução de  $10^{-7}$  M retiraram-se 5  $\mu$ L que foram adicionados a 5 mL de metanol, perfazendo a solução de  $10^{-10}$  M. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, obtendo-se mais duas soluções de TCS de concentrações  $10^{-13}$  M e  $10^{-16}$  M. Em seguida, da solução mãe foram retirados 50  $\mu$ L aos quais se juntaram 5 mL de água ultra-pura, perfazendo a amostra de concentração  $10^{-6}$  M de TCS. Da amostra de  $10^{-6}$  M foram retirados 50  $\mu$ L aos quais se adicionaram 5 mL de água ultra-pura, perfazendo a amostra de concentração  $10^{-9}$  M. O mesmo processo foi repetido mais três vezes perfazendo as amostras de concentrações  $10^{-12}$  M,  $10^{-15}$  M e  $10^{-18}$  M.

### **3.1.2 Em leite**

Para as amostras de leite dopadas com TCS seguiu-se o procedimento descrito anteriormente substituindo a água ultra-pura por leite. Utilizou-se a forma infantil NAN 1 (0+Months – Stage 1) da Nestlé, adequada para recém-

nascidos como substituto ao leite materno. Para a produção de sete amostras de 5 mL cada foram produzidos 100 mL de leite, onde 90 mL de água ultra-pura são aquecidos até 40°C nos quais se dissolvem 12,9 g do preparado de leite em pó. Depois do leite arrefecer até à temperatura ambiente são preparadas as sete amostras: uma amostra apenas de leite, uma amostra com leite e 1% (50 µL) de metanol e cinco amostras com leite, 1% de metanol e com cinco concentrações diferentes de TCS ( $10^{-18}$  M,  $10^{-15}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-9}$  M e  $10^{-6}$  M).

## **3.2 Língua Electrónica**

### **3.2.1 Língua electrónica aplicada à espectroscopia de impedância**

O conceito de Língua Electrónica (LE), desenvolvida em 1990 por Kiyoski Toko, vai de encontro com a necessidade do desenvolvimento de técnicas de detecção para determinados compostos em matrizes aquosas complexas[9]. A LE é um sistema constituído por vários sensores não específicos com grande sensibilidade e baixa selectividade, capazes de medir a resposta eléctrica de um líquido simples ou complexo a um determinado estímulo, com o objectivo de identificar as amostras e classificá-las quantitativa e qualitativamente através de métodos estatísticos[27].

Um dos métodos mais utilizados em LE baseia-se na IS, vantajosa por não necessitar de um eléctrodo de referência, ao contrário dos métodos electroquímicos, e os materiais de medição não terem de ser necessariamente electroactivos. O sensor, dois eléctrodos interdigitados em substrato de vidro, revestidos de filmes finos para aumentar a sua sensibilidade e selectividade, fica em contacto com a solução/emulsão a analisar e esta análise é feita através de

um analisador de impedância. A impedância pode ser medida no domínio do tempo ou no domínio da frequência[2].

### 3.2.1.1 Sensores com eléctrodos interdigitados

A configuração interdigitada de um sensor permite um aumento da sensibilidade e dos limites de detecção, sendo apropriada para o desenvolvimento de biossensores. Uma das principais vantagens destes eléctrodos é a de permitirem trabalhar com baixas concentrações de amostra. A capacitância do sensor interdigitado só muda se existirem alterações na espessura da camada sensorial ou na distância entre dedos.

De modo a melhorar a sensibilidade do sensor interdigitado, serão depositados variados filmes finos sobre o sensor. Estes filmes serão descritos nas secções 3.3 e 3.4. Na Figura 3.1 encontra-se a representação esquemática de um sensor constituído por um par de eléctrodos interdigitados de ouro depositados sobre uma barra de vidro.

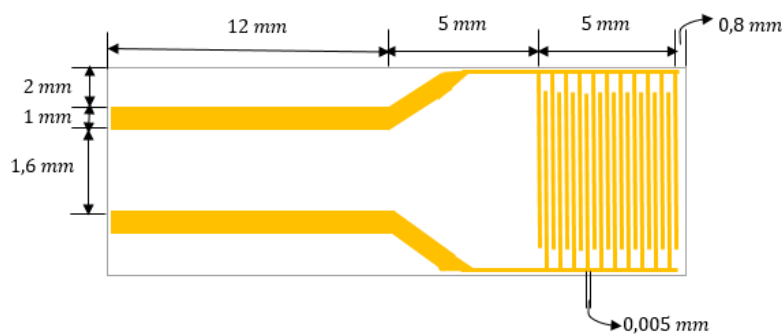


Figura 3.1: Representação dimensional de um sensor com eléctrodos interdigitados de ouro depositados sobre vidro[2].

### 3.2.2 Caracterização eléctrica por espectroscopia de impedância

As medições eléctricas para avaliar o comportamento eléctrico de materiais de eléctrodos e/ou electrólitos são normalmente feitas com células com dois eléctrodos idênticos aplicados nas faces de uma amostra na forma de um cilindro circular ou paralelepípedo rectangular. Numa abordagem geral esta técnica consiste em aplicar um estímulo eléctrico (uma tensão ou corrente conhecida) aos eléctrodos e observar a resposta (a corrente ou tensão resultante). Vários processos microscópicos fundamentais ocorrem em toda a célula quando esta é electricamente estimulada e, em conjunto, conduzem à resposta eléctrica global[28].

Existem três tipos diferentes de estímulos eléctricos que são usados em espectroscopia de impedância (*Impedance Spectroscopy*, IS). Em primeiro lugar, em medidas transitórias, pode ser aplicada uma função escalonada da tensão [ $V(t)=V_0$  para  $t>0$ ,  $V(t)=0$  para  $t <0$ ] em  $t = 0$  ao sistema, com uma corrente variável no tempo,  $i(t)$ . A relação  $V_0/i(t)$ , muitas vezes chamada de impedância indutiva, mede a impedância resultante da perturbação da função escalonada da tensão na interface electroquímica. Esta quantidade, embora facilmente definida, não é a impedância usual referida em IS. À impedância indutiva é aplicada uma transformada de Fourier ou de Laplace, passando do domínio do tempo para o domínio da frequência. A vantagem desta abordagem, além de ser facilmente aplicada experimentalmente, é o facto de a partir da tensão ser possível controlar a taxa de reacções electroquímicas que ocorrem na interface. As desvantagens incluem a necessidade de realizar uma transformação integral dos resultados e o facto de a relação sinal-ruído variar entre frequências diferentes, pelo que a impedância pode não estar bem determinada sobre a gama de frequências desejadas[28].

Uma outra técnica de IS consiste em aplicar um sinal  $v(t)$  composto de ruído aleatório (branco) na interface e medir a corrente resultante. Mais uma vez, é aplicada uma transformada de Fourier, de forma a passar para o domínio da frequência e medir a impedância. Uma vez que apenas é aplicado um sinal à interface, durante um curto período de tempo, esta abordagem permite que os dados sejam colectados de forma rápida[28].

A terceira abordagem, a mais comum, consiste em aplicar uma tensão ou corrente com uma única frequência à interface, e medindo o desvio entre fase e amplitude, da corrente resultante naquela frequência aplicando uma transformada de Fourier rápida, é possível medir a impedância. As vantagens desta abordagem são a acessibilidade de instrumentos que medem a impedância e a sua fácil utilização, bem como o facto de ser possível obter a relação sinal/ruído na gama de frequências de maior interesse. Estas três abordagens podem ainda ser combinadas de forma a gerar outros tipos de estímulos[28].

### **3.2.3 Análise de Componentes Principais**

A PCA desenvolvida por Pearson (1901) e Hotelling (1933), é uma técnica estatística de análise multivariada que permite analisar um grande número de dados sem perdas significativas de informação, ao transformar um conjunto original de variáveis correlacionadas num conjunto menor de novas variáveis não correlacionadas - as Componentes Principais. Com esta transformação eliminam-se também algumas variáveis originais que possam possuir pouca informação. Cada componente principal resulta da combinação linear de todas as variáveis iniciais, sendo as componentes principais independentes entre si. A selecção das componentes principais é feita de acordo com a informação estatística que apresentam, ou seja, a primeira componente principal será a que apresenta maior informação estatística e maior variância, estando cada componente seguinte por ordem decrescente de variância, respeitando a condição de ser ortogonal com as componentes anteriores. Esta técnica permite agrupar observações semelhantes pela interpretação de gráficos bidimensionais[2]. Neste trabalho usou-se o programa de PCA disponibilizado na *internet* no seguinte *link*: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.

### 3.3 Deposição de filmes finos pela técnica camada sobre camada

#### 3.3.1 Materiais

Neste capítulo serão apresentados todos os materiais usados na produção de filmes através da técnica camada sobre camada.

##### 3.3.1.1 Polieletrólitos

###### 3.3.1.1.1 *Poly (allylamine hydrochloride) (PAH)*

O PAH é um polieletrólito catiónico com peso molecular médio de  $M_w=93,56 \text{ g.mol}^{-1}$ , em que a sua cadeia de monómeros possui um grupo catiónico  $NH_3^+$  ligado a um anião  $Cl^-$  [2]. A solução de PAH foi preparada com água ultra-pura de modo a perfazer uma concentração de  $10^{-2} M$ . A sua estrutura molecular está representada na Figura 3.2.

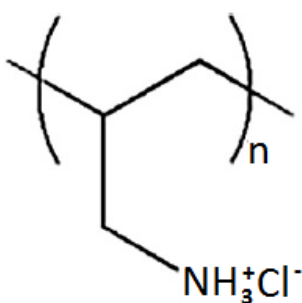


Figura 3.2: Estrutura molecular do polieletrólito PAH[29]

###### 3.3.1.1.2 *Polyethyleneimine (PEI)*



O PEI utilizado, em estado líquido e com peso molecular médio  $M_w=750 \text{ g mol}^{-1}$ , apresenta uma diluição de 50% em água e evidencia uma estrutura em cadeia ramificada. Este tipo de estrutura possui grupos aminas primários ( $R_1 - NH_2$ ), secundários ( $R_1R_2NH$ ) e terciários ( $R_1R_2R_3N$ ), de acordo com a Figura 3.3. O PEI tem sido utilizado como um precipitante de proteínas de ácidos nucleicos e é utilizado no pré-tratamento de filtros para aumentar a ligação de proteínas. A solução de PEI foi preparada com água ultrapura de modo a perfazer uma concentração de  $10^{-3} \text{ M}$ [2].

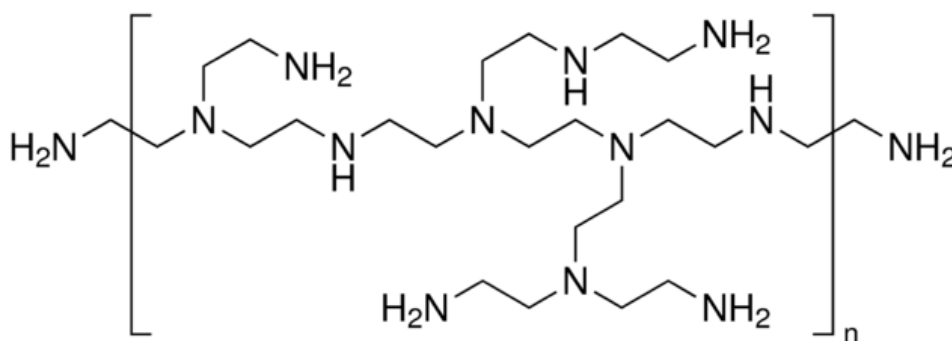


Figura 3.3: Estrutura molecular do polieletrólito PEI[29]

#### 3.3.1.1.3 Polystyrenesulfonate (PSS)

O PSS é um derivado de poliestireno pela adição de grupos funcionais sulfonados. Este polieletrólito é amplamente utilizado como resina de permuta iônica para remover íons como potássio, cálcio e sódio de soluções em aplicações técnicas ou médicas. Os polímeros iônicos lineares são geralmente solúveis em água, enquanto os materiais reticulados (chamados resinas) não se dissolvem em água. A solução de PSS foi preparada com água ultra-pura de modo a perfazer uma concentração de  $10^{-2} \text{ M}$ .

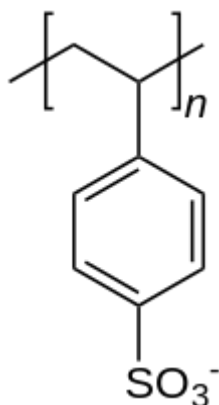


Figura 3.4: Estrutura molecular do PSS[30]

### 3.3.1.2 Óxido de grafeno (OG)

Seleccionou-se também o OG para ser utilizado na monocamada aniónica. A molécula de OG é organizada numa estrutura cristalina hexagonal de átomos de carbono bidimensional, com a espessura de um átomo. O OG é um material com muito boas qualidades mecânicas, eléctricas e térmicas, qualidades estas que se devem às suas propriedades, tais como, elevada área superficial, elevada condutividade térmica e eléctrica, alta flexibilidade e transparência[31]. O OG é formado através da oxidação do grafeno quimicamente modificado, produzindo uma monocamada e tornando-o mais compatível com polímeros orgânicos e com capacidade de fácil dispersão em água. O modelo estrutural actualmente aceite, a configuração de Lerf-Klinowski, consiste numa rede de estruturas hexagonais de carbonos, com grupos carboxilos ( $-COOH$ ) em baixa quantidade, hidróxilos ( $OH-$ ) e epóxidos ( $-O-$ ) nas extremidades[32]. A solução de OG foi preparada com água ultrapura de modo a perfazer uma concentração de  $10^{-2} M$ . Na Figura 3.5 está representada a estrutura molecular do OG.

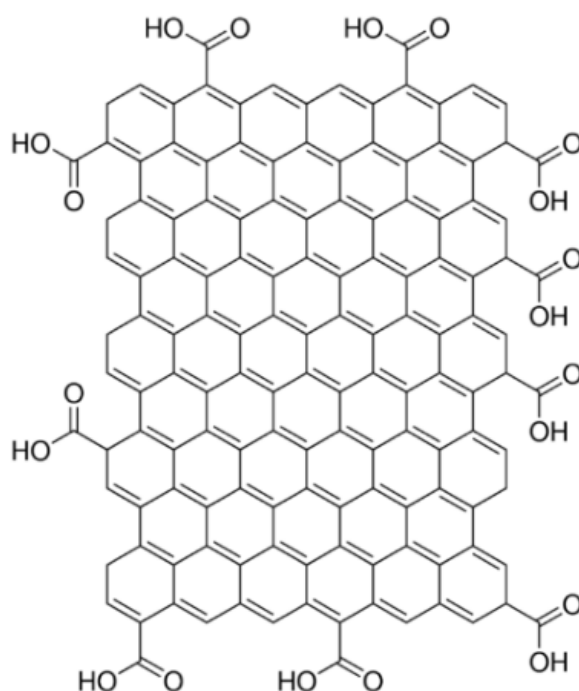


Figura 3.5: Estrutura molecular da molécula de OG[2]

### 3.3.2 Metodologia de preparação de filmes LbL

Tendo em vista aumentar a sensibilidade dos sensores à presença de TCS, a região dos eléctrodos interdigitados dos sensores, isto é, a região sensorial da língua electrónica, é revestida com filmes finos baseados em heteroestruturas moleculares. Estes filmes podem aumentar sua sensibilidade do sensor se essas heteroestruturas sensoriais tiverem a capacidade de aumentar a interacção com a molécula-alvo, neste caso o TCS. Assim, diferentes filmes conferem diferentes propriedades físicas ao sensor. De forma a obter heteroestruturas sensoriais que detectem o TCS usa-se a técnica LbL. A técnica de filmes LbL, apresentada por Decher *et al.*, consiste na deposição/pulverização alternada de soluções aniónicas e catiónicas num substrato sólido, com lavagem com água ultra-pura entre cada deposição/pulverização e secagem a cada bicamada.

Neste trabalho, utilizou-se pulverização para preparar os filmes LbL. Assim, os substratos com os eléctrodos interdigitados, sensores, foram pulverizados alternadamente com soluções catiónicas e aniónicas. Para o processo de pulverização foram usados três pulverizadores, um contendo a solução catiónica, outro a solução aniónica e outro contendo água ultrapura. No momento de pulverização foram colocados a 6 cm de distância da zona de detecção do sensor, região dos eléctrodos interdigitados. De forma a garantir que as camadas de polieletrólito adsorvidas ficavam completas[33] foram sempre feitas duas pulverizações com o mesmo polieléctrico bem como no momento de lavagem com água.

No caso da preparação dos filmes de PEI/OG, a solução catiónica de PEI foi pulverizada duas vezes de forma às moléculas carregadas positivamente adsorverem-se na superfície do sensor. De forma a remover as moléculas de PEI que não ficaram adsorvidas no corpo do sensor, foram realizadas duas pulverizações de água ultra-pura e secou-se o sensor com um jacto de azoto. Agora, o sensor já com uma camada de PEI carregada positivamente está pronto para a adsorção de uma nova camada de polieletrólito de carga oposta que no caso foi o OG. Para a adsorção da camada de OG, foram também realizadas duas pulverizações com solução aniónica de OG, seguidas de duas pulverizações de água ultra-pura, após o que o filme já obtido com duas camadas, portanto, uma bicamada, foi seco com um jacto de azoto. Este processo foi repetido mais 7 vezes, perfazendo um total de 8 camadas de PEI alternadas de 8 camadas de OG, isto é (PEI/OG)<sub>8</sub>.

O processo descrito anteriormente foi realizado também para preparação dos filmes de PAH/OG, PEI/PSS, PAH/PSS.

A distância de pulverização pode variar desde que se garanta a adsorção do filme ao substrato, bem como o número de pulverizações consoante a espessura do filme que se pretenda. Apesar desta técnica não permitir uma construção tão rigorosa na organização estrutural do filme como outras técnicas, apresenta simplicidade na produção de filmes e custos reduzidos, permitindo o controlo da espessura do filme e das suas propriedades, podendo ser utilizada em substratos com diferentes formatos e dimensões[2].

Após a deposição dos filmes, a zona activa de cada sensor foi imersa nas diferentes amostras de soluções com diferentes concentrações de TCS de forma a medir a variação da impedância eléctrica do sensor na presença de diferentes concentrações de TCS. A análise espectral das amostras para cada filme foi feita da menor para a maior concentração, seguindo a seguinte ordem: a primeira amostra a ser analisada foi a de água ultra-pura, de seguida a de água ultra-pura com 1% de metanol e por fim as 5 amostras com diferentes concentrações de TCS, desde a concentração  $10^{-18}$  M, passando por  $10^{-15}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-9}$  M e terminando em  $10^{-6}$  M.

No caso das medições em que foi usado um sensor simples entre cada medição o sensor é lavado com esguicho cinco vezes com água ultra-pura, cinco vezes com álcool e novamente cinco vezes em água ultra-pura, sendo depois seco com papel absorvente. No caso das medições em que foram usados os sensores revestidos por filmes finos, de forma a preservar o filme, não foi feita a lavagem com álcool, apenas com água ultra-pura.

### 3.4 Impressão molecular numa superfície

#### 3.4.1 Materiais

##### 3.4.1.1 *Methacryloyl amido glutamic acid (MAGA)*

O MAGA foi produzido de acordo com o seguinte procedimento. Num balão de 250 mL adicionaram-se 2,0032 g de ácido glutâmico e 32,68 mL de *THF/H<sub>2</sub>O*, mantendo o pH entre 8-9 com 2 M de *KOH*. O pH foi medido repetidamente com papel medidor de pH, sendo adicionadas gotas de *KOH*, sempre que necessário. É importante manter o pH básico de forma a garantir que se dê a reacção pretendida. Caso o pH estivesse ácido, o ácido glutâmico não iria

reagir com o *methacryloyl chloride* e sim com a água presente. De seguida juntou-se 1,48 mL de *methacryloyl chloride* dissolvido em 10,92 mL de *THF* e, mais uma vez, foram-se adicionando gotas de 2 M de *KOH* de forma a manter o pH entre 8-9. Passadas 2h adicionaram-se 10% de *HCl* em banho de gelo, gota a gota, até ser atingido um pH entre 4-5. O pH foi medido com papel indicador de pH. O balão é colocado no evaporador de forma a remover toda a fase líquida, com o cuidado de colocar o banho à temperatura ambiente de forma a que o produto não polimerize.

Depois de evaporar todo o líquido do produto no evaporador, este foi colocado no exsiccador de forma a extrair toda água presente no balão. Depois de seco adicionou-se metanol de forma a extrair o produto do sal formado, que à partida era cloreto de sódio. O produto foi filtrado e colocou-se de novo no exsiccador. Finalmente fez-se *Attenuated Total Reflection* (ATR) e *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) que confirmaram a síntese de MAGA.

Confirmou-se que o sólido branco extraído do produto de facto era cloreto de sódio, pois a 280°C não fundiu, o que indica tratar-se de cloreto de sódio, cujo ponto de fusão é 801°C, e não do produto desejado. Por outro, o ponto de fusão do nosso produto registado foi de 80°C, o que indica tratar-se do MAGA.

#### 3.4.1.2 Tampão fosfato

Para a preparação de 1 M de tampão fosfato, inicialmente foram preparadas duas soluções de *stock*: uma solução de 1 M de  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , misturando 9,4071 g em 52,9 mL de água ultra-pura, e uma solução de 1 M de  $NaH_2PO_4$ , misturando 11,6971 g em 97,5 mL de água ultra-pura. Para preparar a solução tampão fosfato de sódio a pH 6 misturaram-se 87,7 mL da solução de 1M de  $NaH_2PO_4$  e 12,3 mL da solução de 1 M de  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ [34].

### 3.4.1.3 *Allylmercaptane*

*Allylmercaptane* (AM) é um derivado da alila e um composto organossulfurado derivado do alho e de algumas plantas do género *Allium*. Foi demonstrado ser um inibidor da histona desacetilase[35].

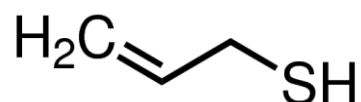


Figura 3.6: Estrutura molecular do AM[30]

### 3.4.1.4 *N,N'*-azobisisobutyronitrile

O *azobisisobutyronitrile* (AIBN) é um composto orgânico solúvel em álcoois e solventes orgânicos, mas insolúvel em água. É usado frequentemente como espumante em plásticos e borracha e como iniciador radical. Na sua reacção mais característica o AIBN decompõe-se eliminando uma molécula de azoto gasoso para formar dois radicais 2-cianoprop-2-ilo:

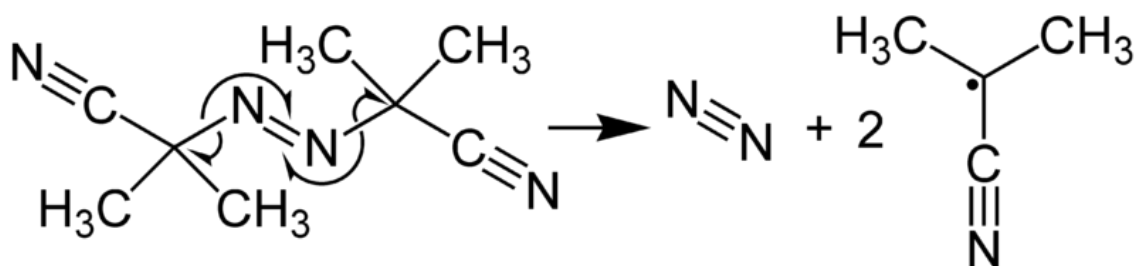


Figura 3.7: Reacção de decomposição do AIBN[36]

Estes radicais podem iniciar polimerizações de radicais livres que é o que se pretende no presente estudo[36].

### 3.4.1.5 2-hydroxyethyl methacrylate

O *hydroxyethyl methacrylate* (HEMA) é preparado num único passo a partir do metacrilato de metilo ou ácido metacrílico e pode ser facilmente polimerizado como a maioria dos derivados metacrílicos. É um polímero hidrofóbico, no entanto quando entra em contacto com a água absorve-a devido à presença de um grupo hidrofílico. Dependendo da estrutura física e química do polímero este é capaz de absorver entre 10 a 600% de água em relação ao seu peso seco. Devido a esta propriedade foi um dos primeiros materiais a ser usado com sucesso na fabricação de lentes de contacto. Devido às suas propriedades físicas de permeabilidade e viscoelasticidade este polímero tem inúmeras aplicações biomédicas[37].

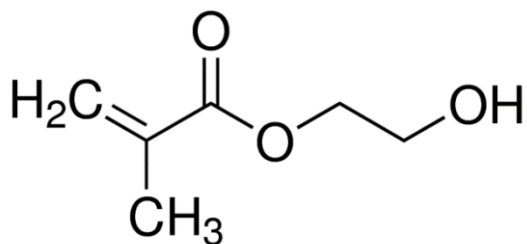


Figura 3.8: Estrutura molecular do HEMA[30]

### 3.4.1.6 Ethylene glycol dimethacrylate

O ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) é um diéster formado por condensação de dois equivalentes de ácido metacrílico e um equivalente de etilenoglicol. O EGDMA pode ser utilizado em reacções de reticulação de co-polímeros de radicais livres.

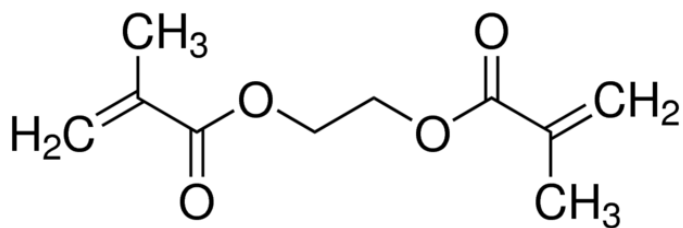


Figura 3.9: Estrutura molecular do EGDMA[38]



### 3.4.2 Metodologia

Inicialmente, mergulhou-se a região de eléctrodos interdigitados do sensor em 20 mL de solução piranha ácida ( $H_2SO_4:H_2O_2 - 3:1, v/v$ ) durante 5 min de forma a extrair todos os compostos orgânicos. Lavou-se o sensor com álcool etílico e secou-se em estufa em vácuo (200 mmHg, 35°C) durante 2h. Passado 2h o sensor foi mergulhado em solução de etanol diluído em água ultra-pura (*etanol*:  $H_2O - 4:1, v/v$ ) contendo 3,0 M de *allylmercaptane* (6,018 mL de água ultra-pura, 24,072 mL de etanol e 9,91 mL de *allylmercaptane*) durante 24h, de maneira a adsorver uma monocamada. Passadas as 24 h o sensor foi lavado com etanol e secou-se em atmosfera de azoto à temperatura ambiente.

#### 3.4.2.1 Polimerização da superfície do sensor

Imprimiu-se um filme de TCS impresso com p(HEMA) no sensor modificado com *allylmercaptane*. Misturou-se TCS e MAGA numa razão molar de 2:1 em 500  $\mu$ L de solução tampão fosfato (pH 6,0) à temperatura ambiente durante 3h. A quantidade de TCS usada foi 10 vezes menos que a quantidade de EGDMA, ou seja, 0,077g de TCS e 0,028 g de MAGA. Dissolveram-se 5,0 mg de AIBN como iniciador em 1250  $\mu$ L de HEMA e 500  $\mu$ L de EGDMA. A esta solução foram adicionados 200  $\mu$ L do complexo MAGA-TCS de forma a obter uma solução de reserva do monómero. De seguida gaseificou-se a solução com gás nitrogénio durante 15 min. Retiraram-se 20  $\mu$ L da solução de reserva do monómero e deixaram-se cair sobre a superfície do sensor. De seguida, pelo método de revestimento por centrifugação, *spin coating*, depositou-se uma película fina e uniforme na superfície do sensor. Após 10 s, removeu-se o sensor do *spin coating* e iniciou-se a polimerização sob luz UV (8 W, 365 nm). Passadas 12,5 h lavou-se o sensor revestido com o polímero 3 vezes com etanol e depois secou-se em estufa a vácuo. O sensor foi armazenado numa caixa sem flutuações de temperatura e pressão.

### 3.4.2.2 Remoção de TCS da superfície do sensor

Para a mistura de TCS e MAGA as interações electroestáticas e a ligação de hidrogénio ocorrem entre os grupos de ácido carboxílico do monómero MAGA e os grupos polares de moléculas de TCS. Para quebrar as ligações utilizou-se solução aquosa de *NaCl*, 1,0 M, como agente de dessorção. O sensor é mergulhado 3 vezes em 25 mL de solução de *NaCl*. Após a remoção do TCS o sensor é lavado 3 vezes com água ultra-pura e seco em vácuo à temperatura ambiente.

A zona activa de cada sensor foi imersa nas diferentes amostras de leite com diferentes concentrações de TCS de forma a medir a variação da impedância electrónica do sensor na presença de diferentes concentrações de TCS. A análise espectral das amostras foi novamente feita da menor para a maior concentração, seguindo a seguinte ordem: a primeira amostra a ser analisada foi a de água ultra-pura, de seguida a amostra de leite, seguindo-se a amostra de leite com 1% de metanol e por fim as 5 amostras leite com 1% de metanol e com diferentes concentrações de TCS, desde a concentração de  $10^{-18}$  M, passando por  $10^{-15}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-9}$  M e terminando em  $10^{-6}$  M. Entre cada medição o sensor foi lavado entre 5 a 10 vezes com água ultra-pura.

## 3.5 Outras técnicas de caracterização

Neste capítulo serão descritas as técnicas usadas para a caracterização do MAGA.

### 3.5.1 Espectroscopia de infravermelhos

Esta técnica consiste na medição da energia absorvida na região de infravermelho e para tal incide-se radiação de número de onda compreendido

entre 4 000 e os 400  $\text{cm}^{-1}$  e analisa-se o espectro resultante da interacção desta radiação com as moléculas da amostra. De facto, quando as moléculas expostas a essa radiação absorvem e convertem a radiação em energia rotacional e vibracional, permitindo-nos observar os espectros das bandas de energia absorvidas, que são característicos dos grupos funcionais das moléculas[39].

### ***3.5.2 Proton NMR Spectrometry***

Sob condições adequadas num campo magnético, uma amostra pode absorver a radiação electromagnética na região de radiofrequência em frequências governadas pelas características da amostra. A absorção é função de certos núcleos na molécula. Um gráfico das frequências dos picos de absorção versus intensidades de pico constitui um espectro de RMN[39].

### ***3.5.3 Carbon-13 NMR Spectrometry***

Os esqueletos de carbono dos anéis e cadeias são fundamentais para a química orgânica, o que nos levaria a pensar que o átomo de carbono é aquele que nos permite uma investigação mais imediata. O problema é que o esqueleto de carbono consiste quase completamente no núcleo de carbono-12, que não é acessível à espectrometria de RMN. Temos que lidar com uma quantidade muito pequena do núcleo de carbono-13.

O núcleo de carbono-12 não é magneticamente activo (o número de rotação,  $I$ , é zero), mas o núcleo de carbono-13, como o núcleo de hidrogénio-1, possui um número de rotação de  $1/2$ . No entanto, uma vez que a abundância natural de carbono-13 é apenas 1,1% da do carbono-12 e a sua sensibilidade é apenas cerca de 1,6% da do hidrogénio-1, e a sensibilidade geral do carbono-13 em comparação com a do hidrogénio-1 é cerca de  $1/5700$ . O procedimento de leitura requer uma

grande amostra e um tempo extremamente longo para obter um espectro de carbono-13[39].



# 4

## Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais de espectroscopia de impedância que permitem a caracterização dos diferentes sensores desenvolvidos bem como a sua discussão.

De modo a garantir que tanto os eléctrodos como o analisador de impedância são funcionais, efectuou-se inicialmente a análise espectral de impedância em água ultra-pura em vários ensaios realizados a  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ , utilizando eléctrodos sem quaisquer revestimentos sensoriais. Foi possível discernir sobre a estabilidade e reprodutibilidade das medidas de impedância em geral. Em todos os casos, as amostras de água ultrapura estavam frescas, isto é, retiradas do equipamento Millipore imediatamente antes de cada medição, a fim de assegurar a qualidade da água.

De seguida testaram-se soluções com diferentes concentrações de TCS com sensores com eléctrodos descobertos (simples) e com eléctrodos revestidos por variados filmes finos.

## **4.1 Caracterização dos espectros de impedância dos eléctrodos interdigitados sem camadas sensoriais em soluções aquosas de TCS**

A análise espectral das soluções de TCS foi efectuada por ordem ascendente de concentração, isto é, começou-se pela concentração mais baixa, água ultra-pura (0 M de TCS), de seguida água ultra-pura com 1% de metanol (0 M de TCS), passando-se depois para as soluções de água ultra-pura com 1% de metanol e com TCS dissolvido, desde a concentração de  $10^{-18}$  M até à concentração mais alta de TCS em água,  $10^{-6}$  M. Deste modo previne-se que uma medição anterior perturbe os resultados da medição seguinte, dado que a quantidade de molécula-alvo que poderá ficar adsorvida no sensor é menor que a quantidade medida em seguida. O sensor foi lavado com água ultra-pura, álcool e novamente com água ultra-pura entre cada medição, como descrito na secção 3.2.2.

Para analisar a impedância em água ultrapura, caracterizaram-se três amostras, retiradas do equipamento da Millipore imediatamente antes de cada medição, de modo a garantir a reprodutibilidade do sistema, a uma temperatura constante de  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  no sistema sensor-amostra. Verificou-se a existência de reprodutibilidade dos dados, ainda que se houvessem ligeiras variações, justificadas pelo facto do sistema utilizado não estar em isolamento e ser muito susceptível a perturbações exteriores, tais como ligeiras alterações de temperatura.

Obtiveram-se os espectros de impedância e de graus de fase de impedância representados, respectivamente, nas Figuras 4.1 e 4.2.

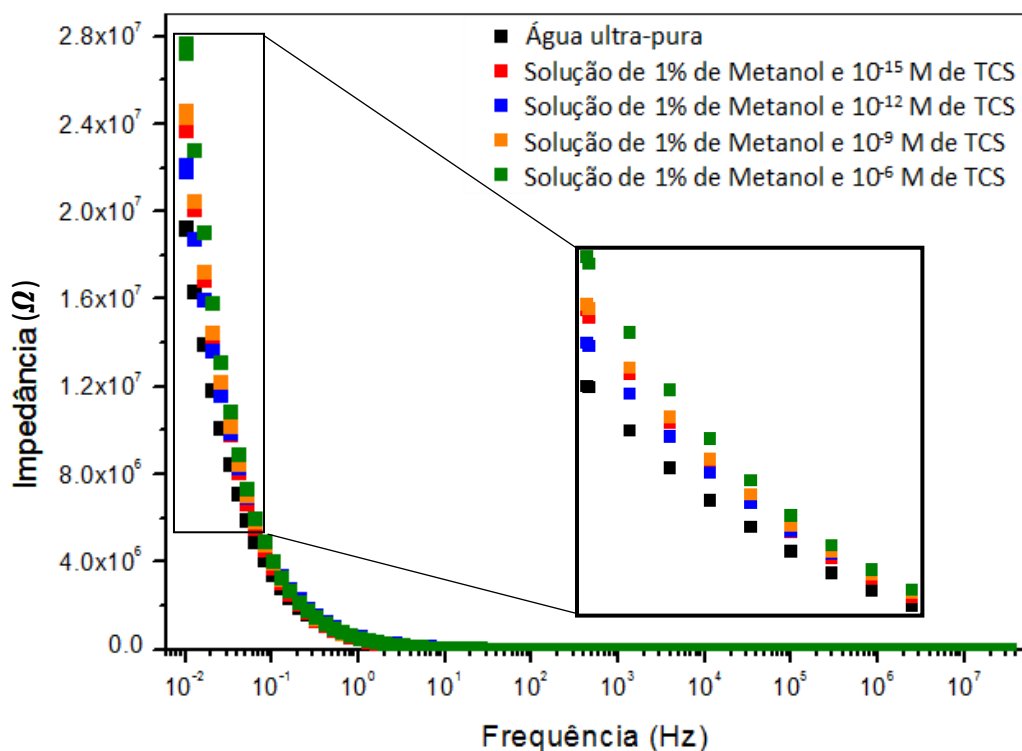


Figura 4.1: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor sem revestimento em água dopada com TCS

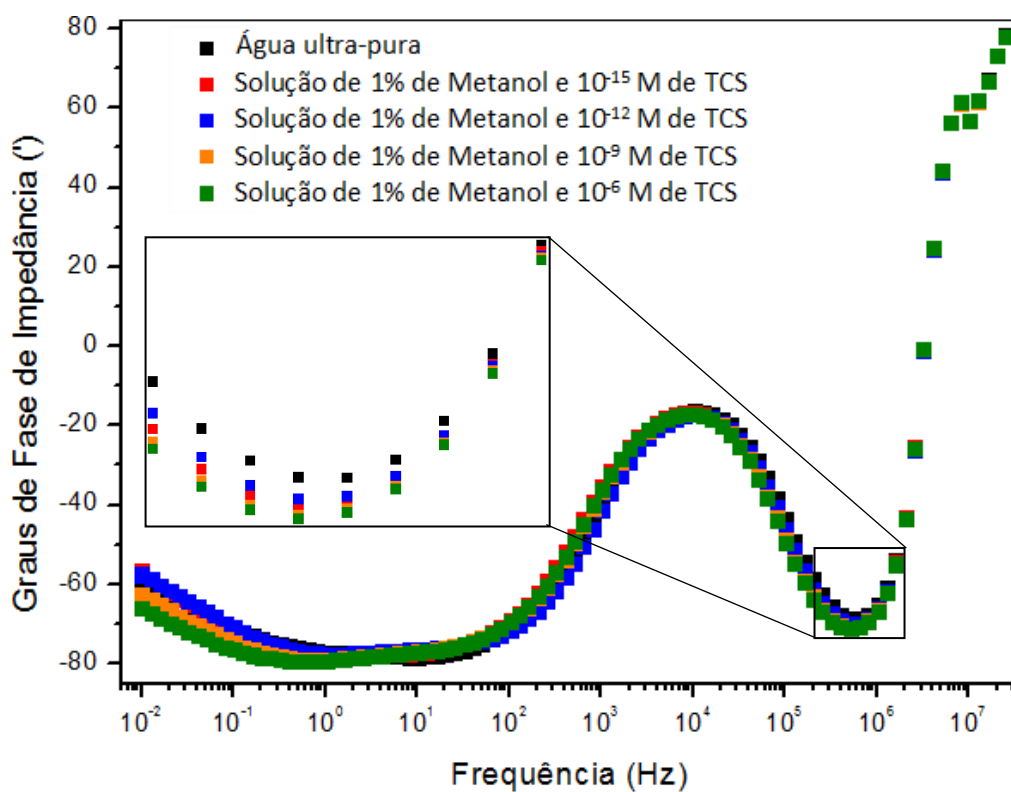


Figura 4.2: Espectro de fase da impedância (°) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor sem revestimento em água dopada com TCS



No espectro de impedância da Figura 4.1, é possível constatar que a impedância apresenta valores maiores para concentrações de TCS maiores, à exceção dos pontos correspondentes à concentração de  $10^{-15}$  M que apresenta valores de impedância maiores do que era esperado. No entanto, para os pontos correspondentes à água ultra-pura e às concentrações  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M, para valores de frequências mais baixas (aproximadamente entre  $10^{-2}$  e  $10^{-1}$  Hz), é claro o aumento da impedância com o aumento da concentração de TCS.

No espectro de fase da impedância apresentado na Figura 4.2 verifica-se a situação inversa. O aumento da concentração de TCS reflecte-se numa diminuição dos valores dos graus de fase de impedância, como é evidenciado nas frequências de ordem de grandeza de  $10^5$  e  $10^6$  Hz. Mais uma vez a curva correspondente à concentração de  $10^{-15}$  M apresenta valores um pouco afastados do esperado.

Para se ter uma ideia de como os resultados obtidos podem ser usados para medir a concentração de TCS, as impedâncias em frequências fixas em  $5.072 \times 10^{-2}$ ,  $4.029 \times 10^{-2}$ ,  $2.542 \times 10^5$  e  $8.038 \times 10^2$  Hz, obtidas de todos os espectros medidos, foram representadas em função da concentração de TCS e são apresentados na Figura 4.3. Foram escolhidos estes valores de frequência por serem aqueles que apresentam um comportamento o mais próximo duma variação linear. De forma a facilitar a análise dos espectros considerou-se a água ultra-pura como uma concentração de  $10^{-24}$  M de TCS e a água ultra-pura com 1% de metanol como uma concentração de  $10^{-21}$  M de TCS, que na verdade correspondem ambas a uma concentração de 0 M de TCS.

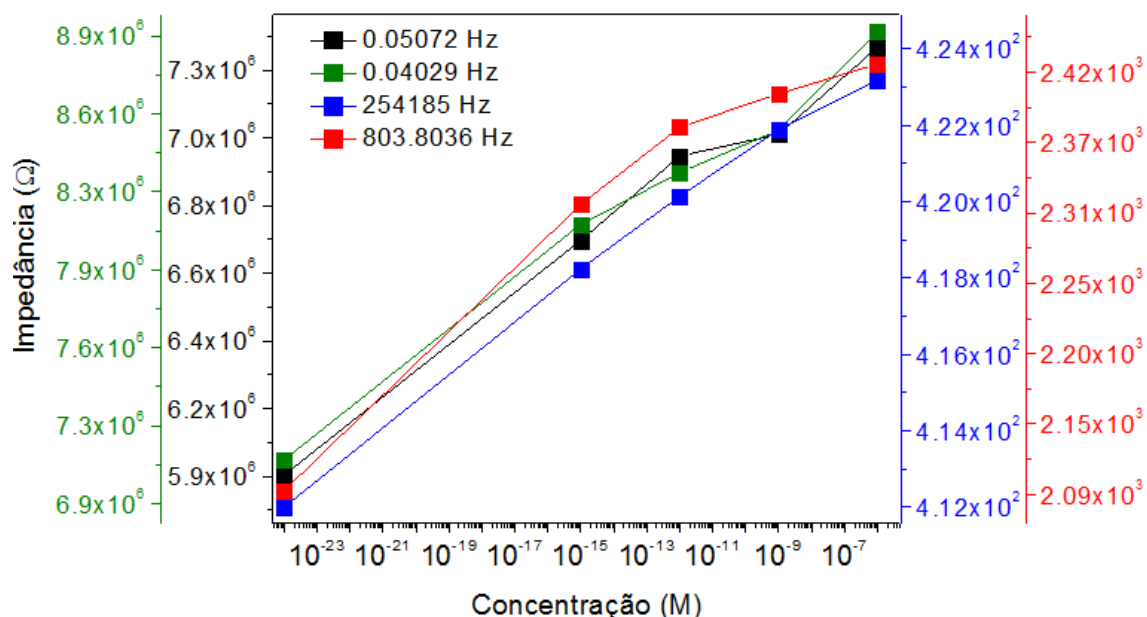


Figura 4.3: Espectro da impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor sem revestimento em água dopada com TCS para as frequências de  $5.072 \times 10^{-2}$ ,  $4.029 \times 10^{-2}$ ,  $2.542 \times 10^5$  e  $8.038 \times 10^2$  Hz

Constatou-se que, independentemente da frequência escolhida, o sensor apresenta uma resposta eléctrica semelhante. À medida que se aumenta a concentração de TCS em factores de  $10^3$ , verifica-se um aumento progressivo da impedância, o que significa que a presença de TCS na água aumenta ligeiramente as suas propriedades resistivas. De modo a garantir que a variação do comportamento do sensor se deve à presença do TCS e não do metanol, todas as soluções têm a mesma quantidade de metanol, que é 1%.

Ao fazer os testes de espectroscopia de impedância, fazendo uso de um sensor interdigitado sem qualquer revestimento sensorial, em soluções de TCS, verificou-se a funcionalidade do sistema. Ao indiciar a presença de TCS para as diferentes concentrações referidas, conclui-se que o desenvolvimento de uma língua electrónica por espectroscopia de impedância é viável. De modo a refinar a sensibilidade do sensor para as concentrações mais baixas estudadas, produziram-se vários filmes finos, utilizando diversas estruturas potencialmente sensoriais.

## **4.2 Caracterização dos espectros de impedância dos eléctrodos interdigitados com camadas sensoriais baseadas em filmes LbL em soluções aquosas de TCS**

Tendo sido verificada a funcionalidade dos eléctrodos interdigitados, pretende-se agora que as propriedades eléctricas do sensor sejam alteradas com a finalidade de melhorar a sua sensibilidade. Para tal, recorreu-se à técnica de LbL para produzir filmes finos sobre os eléctrodos. Foram produzidos filmes finos LbL de (PAH/OG)<sub>8</sub>, (PAH/PSS)<sub>8</sub>, PEI/OG)<sub>8</sub> e (PEI/PSS)<sub>8</sub>. O primeiro termo entre parêntesis refere-se à camada catiónica e o segundo à camada aniónica de cada bicamada. O valor no índice dos parêntesis indica o número de bicamadas produzidas sobre o eléctrodo. Segundo o mesmo procedimento experimental e condições de temperatura para os ensaios realizados sem filmes, analisaram-se soluções aquosas de TCS para as mesmas concentrações, utilizando os sensores descritos anteriormente. Mais uma vez, as medições realizaram-se de forma crescente de concentrações, começando pela água ultrapura, de seguida água ultra-pura e 1% de metanol e terminando nas soluções de água ultra-pura com 1% de metanol e com concentrações de TCS de  $10^{-18}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M.

Novamente, como foi referido no ponto 3.2.2, entre cada medição realizada com os sensores revestidos por filmes foi efectuada apenas lavagem com água ultra-pura, de forma a eliminar o risco de danificar os filmes.

### **4.2.1 Sensor com filme PAH/OG**

Nas Figuras 4.4 e 4.5 encontram-se representados, respectivamente, o espectro de impedância em função da frequência e o espectro de fase da impedância em função da frequência, obtidos para o revestimento de filme com

8 bicamadas de PAH e 8 bicamadas de OG, produzido pela técnica de LbL com *spray*.

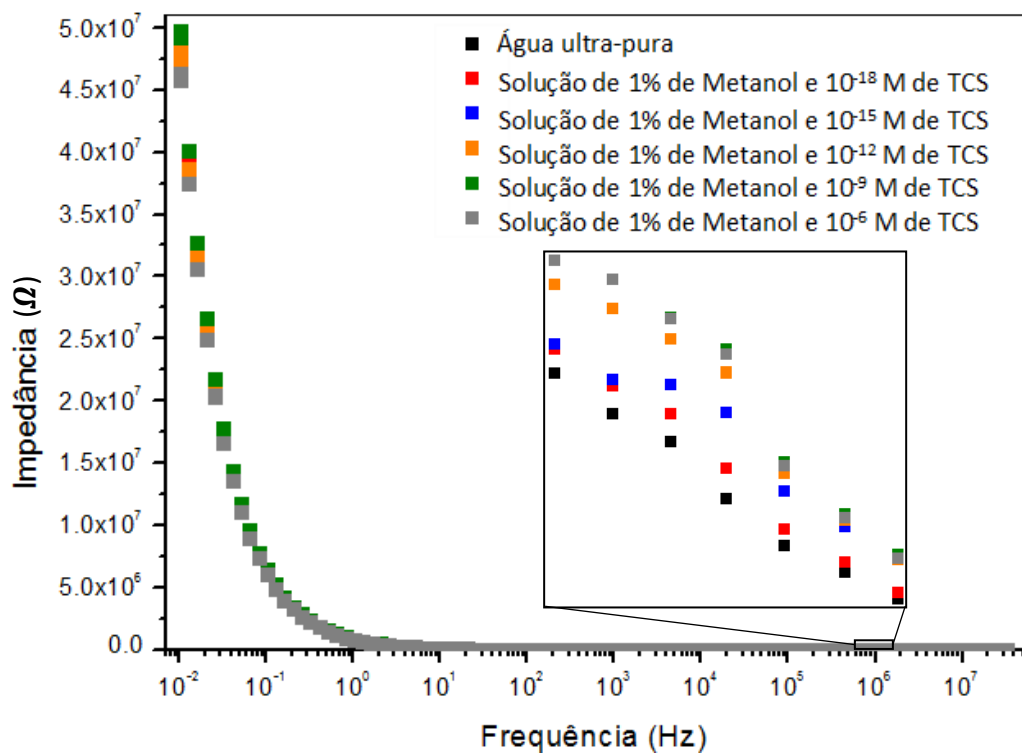


Figura 4.4: Espectro da impedância ( $\Omega$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PAH/OG em água dopada com TCS

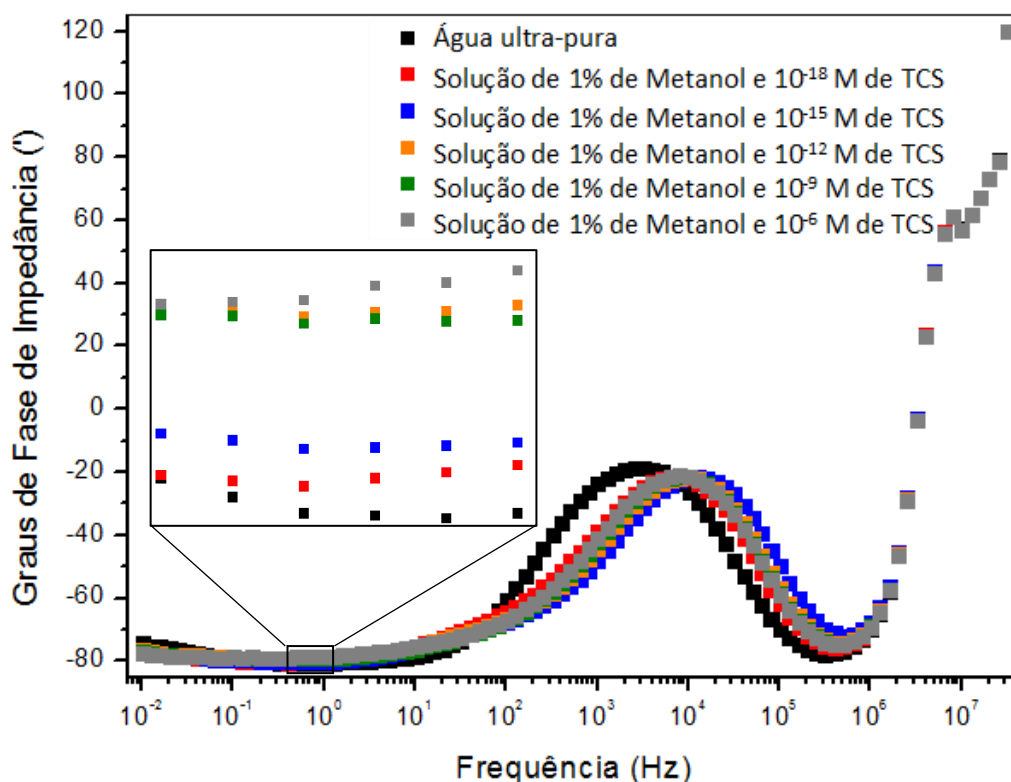


Figura 4.5: Espectro de fase da impedância (°) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PAH/OG em água dopada com TCS

Com o revestimento do sensor verificou-se uma melhoria dos resultados. Para os valores de frequência evidenciados na Figura 4.4 (na ordem dos  $10^6$  Hz) houve um aumento progressivo da impedância com o aumento da concentração de TCS, contrariamente ao que aconteceu para frequências mais baixas. Para os valores de frequência evidenciados na Figura 4.5 (entre  $10^{-1}$  e  $10^0$  Hz) também foi possível observar um aumento dos graus de fase de impedância com o aumento da concentração.

Comparativamente com os valores obtidos para o sensor sem camadas sensoriais, os valores quer de impedância quer de graus de fase de impedância aumentaram ligeiramente, não chegando esse aumento a ser de uma ordem de grandeza.

De forma a analisar a variação da impedância com o aumento da concentração, fixaram-se quatro valores de frequência. Obteve-se o gráfico representado na Figura 4.6.

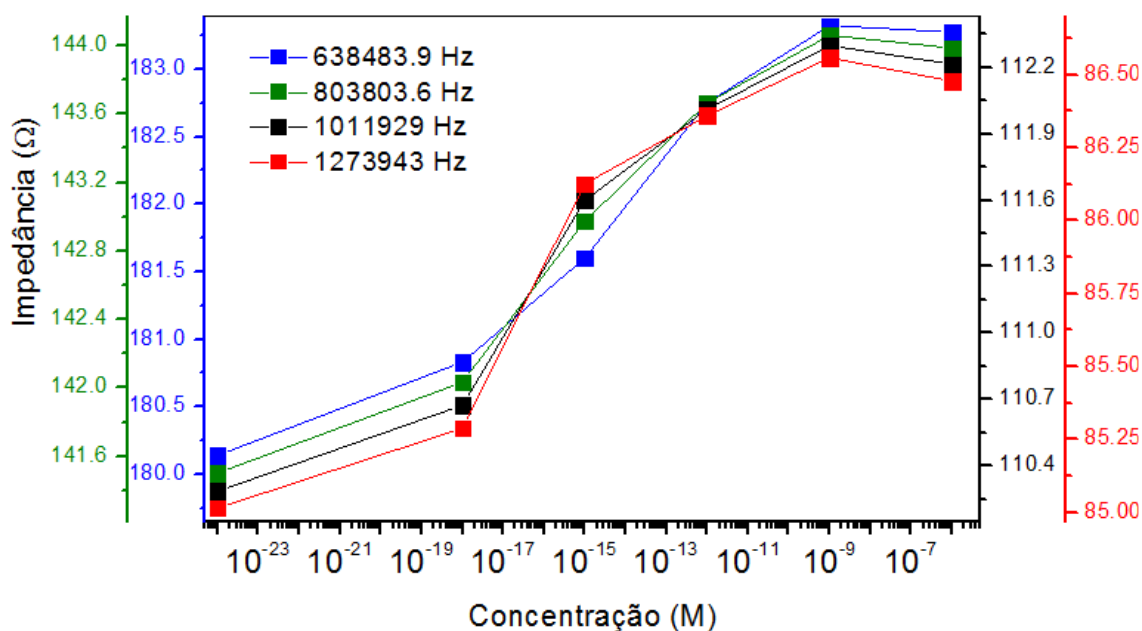


Figura 4.6: Espectro da impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor revestido com filme PAH/OG em água dopada com TCS para as frequências  $6.385 \times 10^5$ ,  $8.038 \times 10^5$ ,  $1.012 \times 10^6$  e  $1.274 \times 10^6$  Hz

Com se pode verificar com o aumento da concentração há um aumento progressivo da impedância, sendo esse aumento mais significativo para concentrações de TCS mais baixas, principalmente entre  $10^{-18}$  e  $10^{-15}$  M. À medida que se aumenta a concentração de TCS nas soluções a variação da impedância é menor, sofrendo aumentos menores. A partir de  $10^{-9}$  M esse aumento transforma-se numa diminuição, indiciando que o sensor possa perder alguma eficiência para concentrações superiores a  $10^{-9}$  M. Embora o sensor seja lavado várias vezes com água ultra-pura entre cada medição, é impossível remover todas as moléculas de TCS adsorvidas na superfície do sensor. À medida que a concentração de TCS aumenta, maior será a quantidade de TCS que ficou adsorvida na superfície do sensor, isto é, quando o sensor é mergulhado nas soluções com maiores concentrações, este já não é tão eficiente.

Do espectro de frequências em que foram feitas as medições, escolheram-se frequências com ordens de grandeza entre  $10^5$  e  $10^6$  Hz, por ser neste intervalo que a evolução da impedância em função da concentração apresentou um comportamento mais coerente. Concluiu-se que o sensor revestido com o filme PAH/OG é mais eficiente na detecção de TCS em condições de elevadas frequências.

#### 4.2.2 Sensor com filme PAH/PSS

Mantendo as mesmas condições experimentais e seguindo o mesmo procedimento seguido para os ensaios anteriores, fez-se novamente a análise de soluções aquosas de TCS para as concentrações testadas no filme anterior, utilizando agora um sensor revestido com um filme constituído por oito bicamadas de PAH e oito bicamadas de PSS.

Foi possível obter espectros de capacitância, espectros de impedância e espectros de graus de fase de impedância em função da frequência, representados, respectivamente, nos gráficos das Figuras 4.7, 4.8 e 4.9.

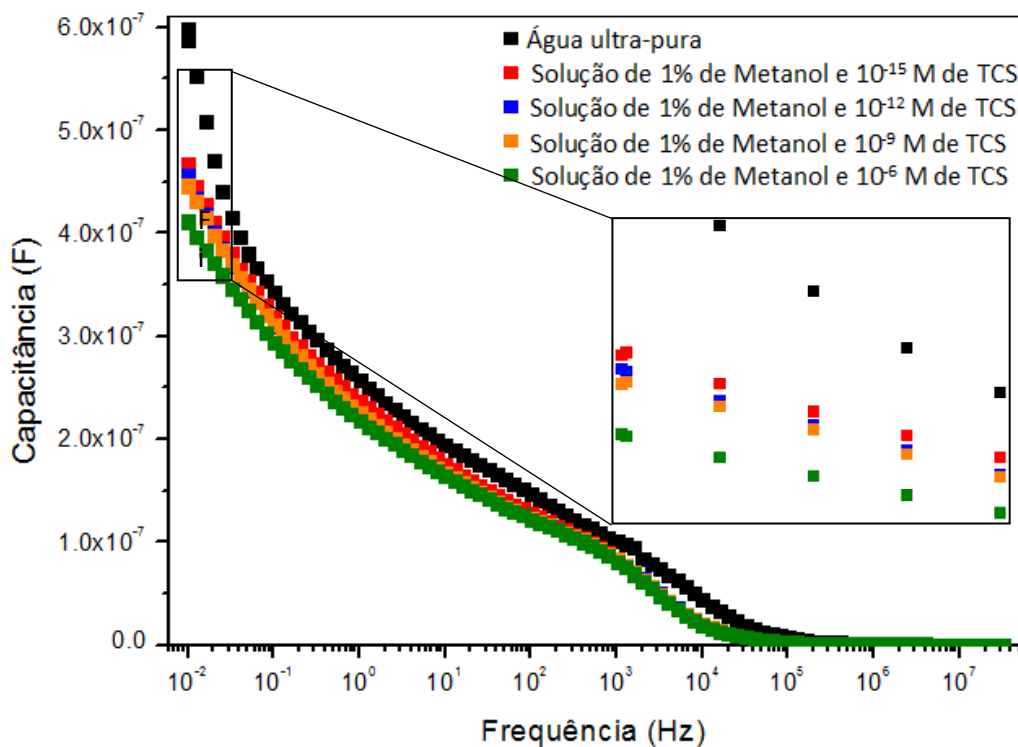


Figura 4.7: Espectro da capacitância (F) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PAH/PSS em água dopada com TCS

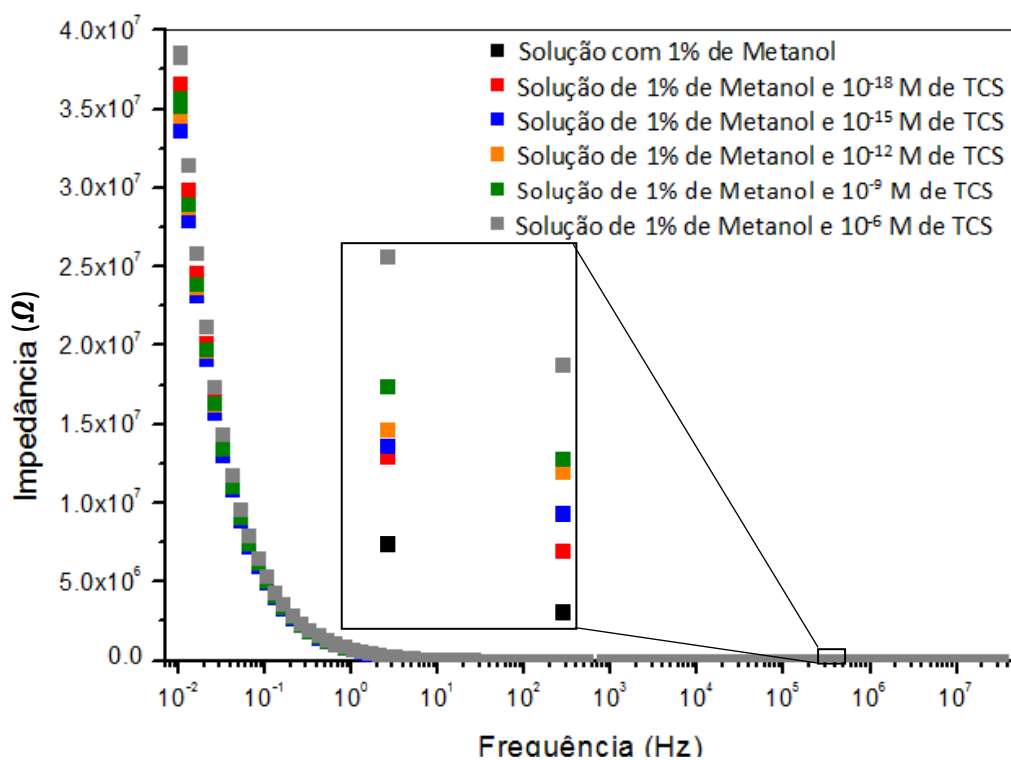


Figura 4.8: Espectro da impedância ( $\Omega$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PAH/PSS em água dopada com TCS

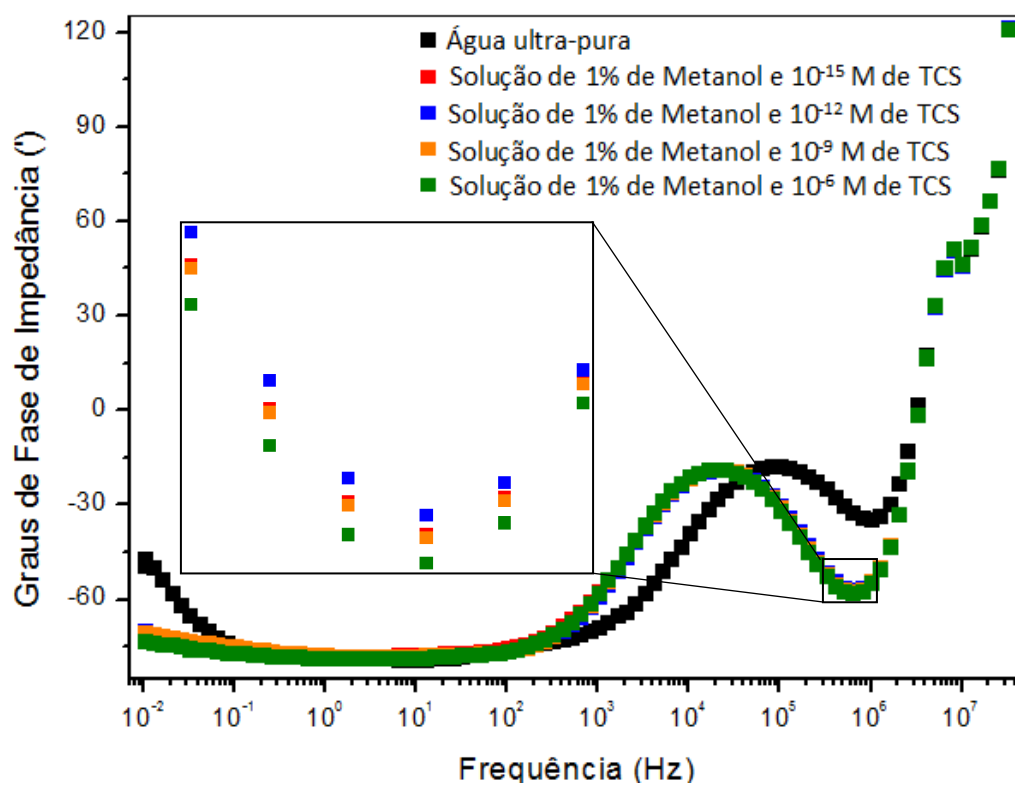


Figura 4.9: Espectro de fase da impedância ( $^{\circ}$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PAH/PSS em água dopada com TCS



No caso da capacitância (Figura 4.7), dos  $10^{-2}$  Hz até aos  $5 \times 10^3$  Hz verifica-se uma diminuição da impedância de aproximadamente uma ordem de grandeza, enquanto que no mesmo intervalo de frequências a impedância (Figura 4.8) diminui aproximadamente cinco ordens de grandeza. Dos  $5 \times 10^3$  Hz até aos  $10^6$  Hz a capacitância diminui cerca de duas ordens de grandeza e a impedância diminuiu uma ordem de grandeza.

A evolução das três grandezas em análise é bastante coerente com o aumento da concentração de TCS. No caso da impedância e dos graus de fase de impedância para os intervalos de frequência seleccionados observou-se uma diminuição progressiva com o aumento da concentração e no caso da capacitância a situação inversa.

Comparativamente com os valores para o eléctrodo sem camadas sensoriais, os valores de impedância aumentaram e em relação aos valores para o eléctrodo revestido pelo filme PAH/OG os valores da impedância diminuíram, não sendo essas variações muito significativas.

Fixando valores de frequência, obtiveram-se os espectros da impedância e da capacitância em função da concentração de TCS representados, respectivamente, nas Figuras 4.10 e 4.11.

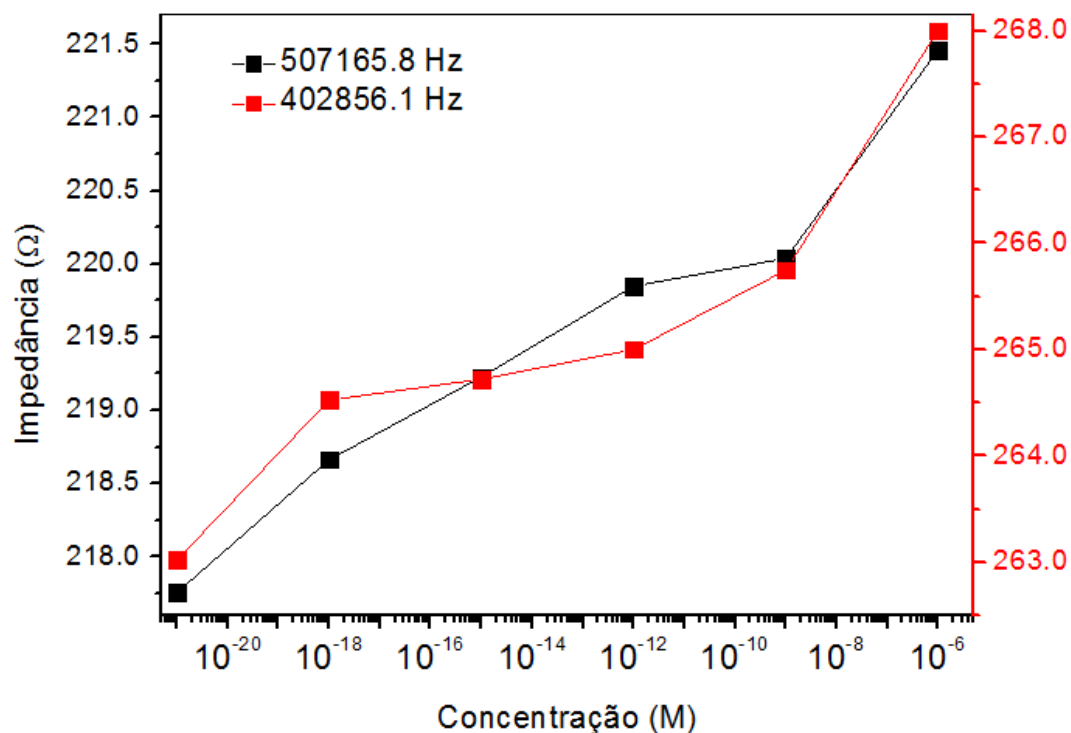


Figura 4.10: Espectro da impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor revestido com filme PAH/PSS em água dopada com TCS para as frequências  $5.072 \times 10^5$  e  $4.029 \times 10^5$  Hz

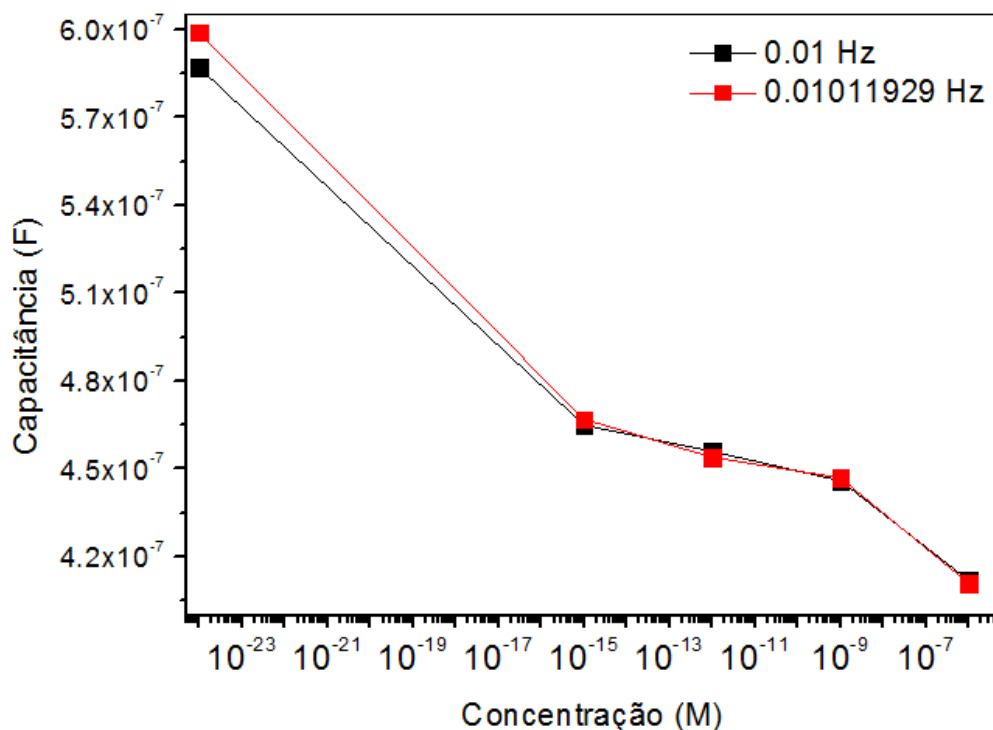


Figura 4.11: Espectro da capacitância (F) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor revestido com filme PAH/PSS em água dopada com TCS para as frequências  $10^{-2}$  e  $1.012 \times 10^{-2}$  Hz

Na Figura 4.11 observou-se que a capacitância diminui com o aumento da concentração da solução, sendo essa variação muito semelhante, independentemente da frequência em que se fez a medição. Pelo contrário, a impedância aumenta progressivamente com o aumento da concentração de TCS.

Ao contrário das medições obtidas com o filme anterior, neste caso, para concentrações mais altas ocorre uma maior variação quer da capacitância quer da impedância, sendo que a maior variação de ambas as grandezas ocorre quando se passa de concentrações de TCS de  $10^{-9}$  para  $10^{-6}$  M.

### 4.2.3 Sensor com filme PEI/OG

Mantendo as mesmas condições experimentais e seguindo o mesmo procedimento para os ensaios anteriores, fez-se a análise de soluções aquosas de TCS, utilizando um sensor com filme (PEI/OG)<sub>8</sub>. Neste caso, e no caso do filme seguinte, apresentado no ponto 4.2.4, o valor de concentração de  $10^{-21}$  M corresponde à água ultra-pura.

Analizando o espectro da impedância em função da frequência representado na Figura 4.12 e comparando com os espectros analisados para os sensores anteriores, sensor simples, sensor PAH/OG e sensor PAH/PSS constata-se que houve um decréscimo bastante significativo da impedância. Por exemplo, para uma frequência de  $10^{-2}$  Hz houve uma diminuição da impedância de cinco ordens de grandeza em relação aos outros revestimentos.

No intervalo de frequência de  $10^{-2}$  a  $10^5$  Hz verificou-se progressivamente uma diminuição da impedância com o aumento da concentração de TCS, havendo um afastamento maior da curva correspondente às medições em que não há TCS dissolvido.

Ao contrário, os graus de fase de impedância (Figura 4.13) aumentam progressivamente com o aumento da concentração de TCS, sendo também bastante evidente a passagem de água ultra-pura para a primeira solução com TCS dissolvido ( $10^{-18}$  M).

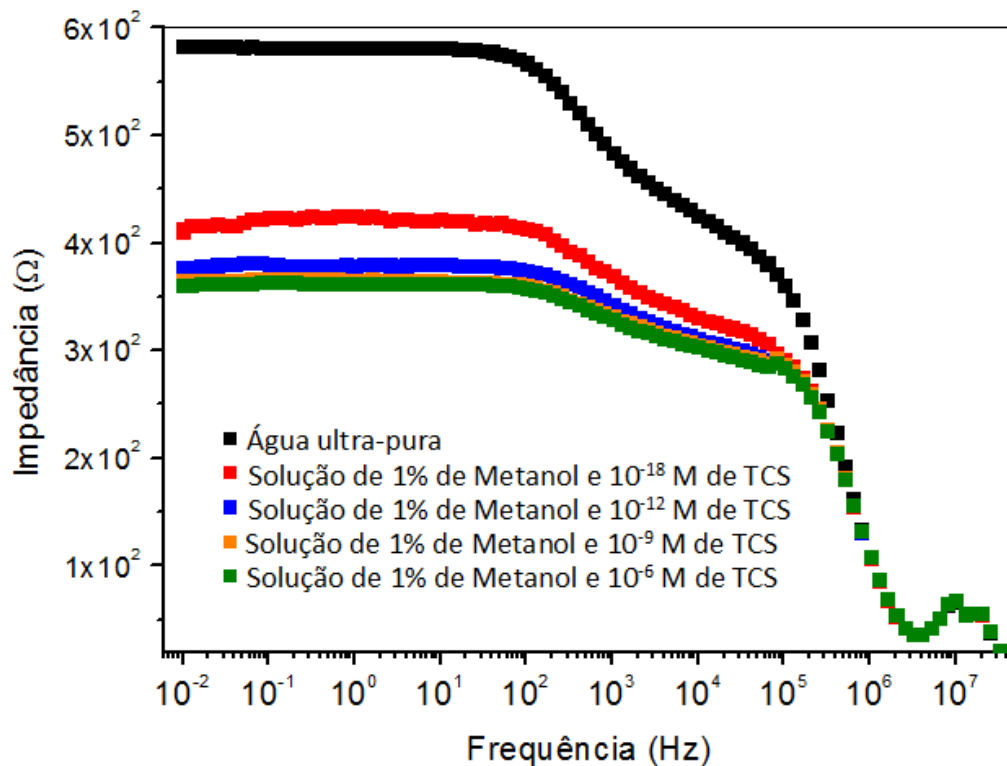


Figura 4.12: Espectro da impedância ( $\Omega$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PEI/OG em água dopada com TCS

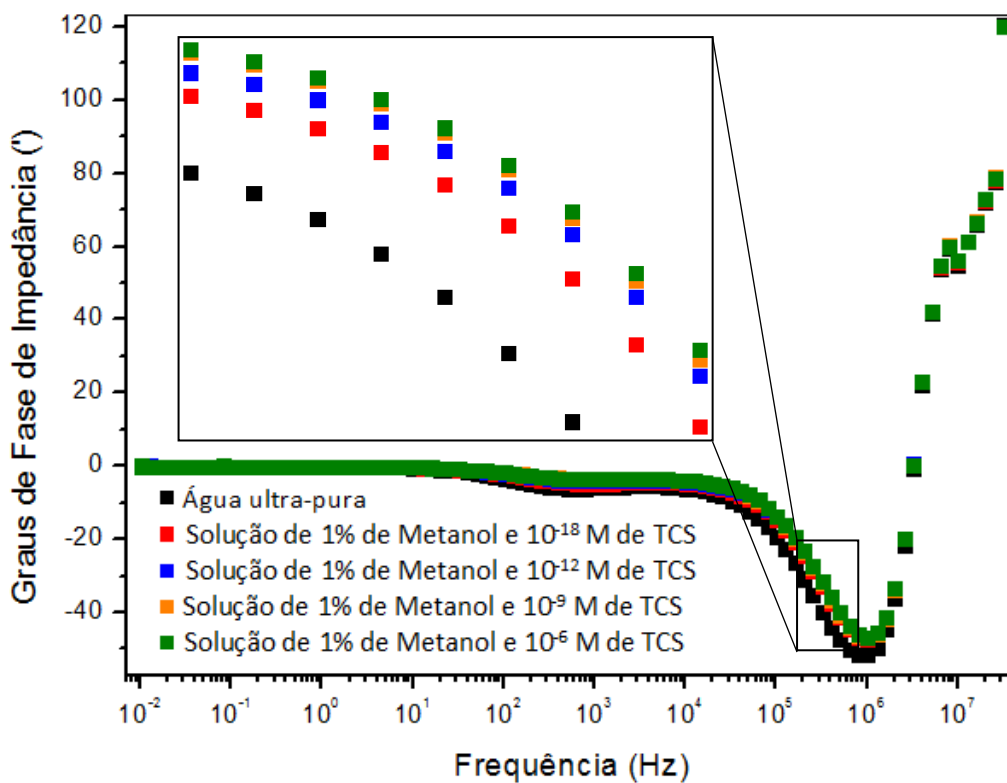


Figura 4.13: Espectro de fase da impedância (°) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PEI/OG em água dopada com TCS

Pela análise do espectro da Figura 4.14, para valores de frequência fixa, verificou-se que tanto para frequências altas como para frequências baixas a impedância diminui de forma com o aumento da concentração, com exceção do ponto correspondente à concentração  $10^{-15}$  M. Constatou-se também que esse afastamento é mais significativo nas frequências altas, isto é, o pico de eficiência deste sensor acontece quando as medições são feitas para frequências baixas. Retirando este ponto de todas as medições para cada frequência obtemos uma evolução da impedância mais coerente. Também nestas medições se verifica uma menor variação da impedância para concentrações maiores, tal como no sensor revestido por PAH/OG. Aparentemente os filmes com OG perdem eficiência para concentrações de TCS maiores.

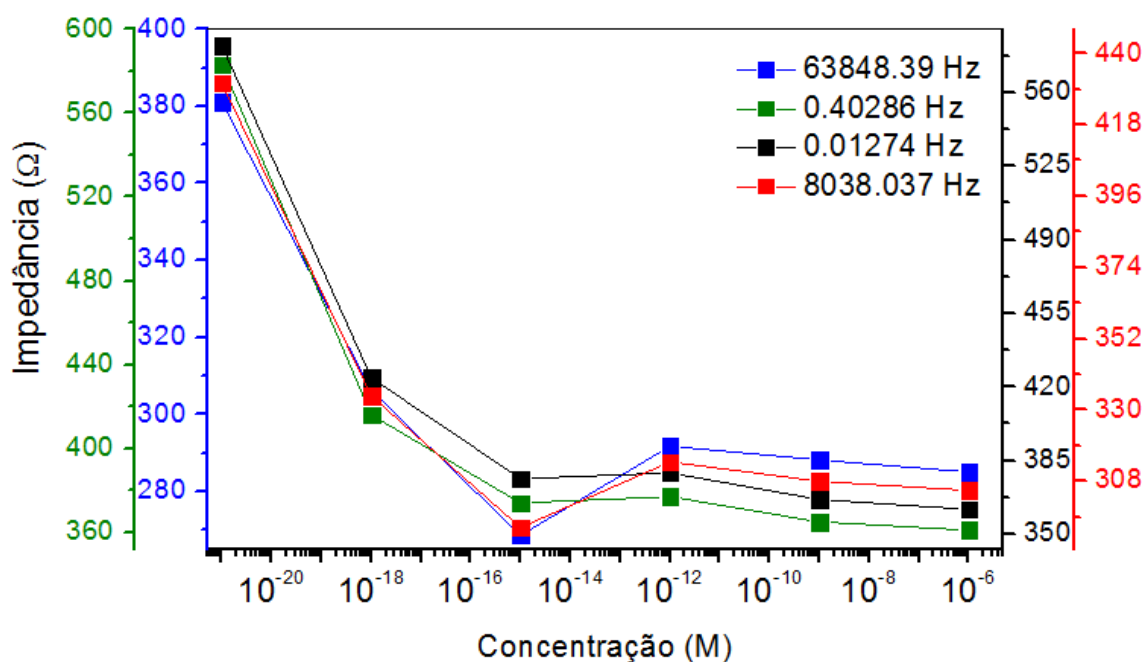


Figura 4.14: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor revestido com filme PEI/OG em água dopada com TCS para as frequências  $6.385 \times 10^4$ ,  $8.038 \times 10^3$ ,  $1.274 \times 10^{-2}$  e  $4.029 \times 10^{-1}$  Hz

#### 4.2.4 Sensor com filme PEI/PSS

Por último, fez-se a análise de soluções aquosas de TCS utilizando um sensor com filme constituído por oito bicamadas PEI/PSS (PEI/PSS)<sub>8</sub>. Mais uma vez, foram mantidas as mesmas condições experimentais e seguido o mesmo procedimento usado para os ensaios anteriores. O comportamento da impedância em função da frequência, representado na Figura 4.15, é semelhante ao já analisado nas medições realizadas para os filmes anteriores.

Comparativamente com os valores para o eléctrodo sem camadas sensoriais, os valores de impedância não apresentam diferenças significativas. Em relação aos valores obtidos para o sensor revestido com PAH/OG houve uma diminuição insignificante da impedância. Em relação aos valores obtidos para o sensor revestido com PAH/PSS a diferença mais significativa entre os valores da impedância verifica-se a uma frequência de  $10^5$  Hz, em que os valores de impedância são maiores no espectro obtido com o sensor revestido pelo filme PEI/PSS. Em relação ao sensor PEI/OG, tal como se verificou com os sensores PAH/OG e PAH/PSS, as diferenças são mais acentuadas, para uma frequência de  $10^{-2}$  Hz houve um aumento da impedância de cinco ordens de grandeza. O sensor revestido com o filme PEI/OG foi sem dúvida o que apresentou um comportamento mais distinto dos restantes sensores e mais coerente com as variações de concentração de TCS nas diferentes soluções.

Para o intervalo de frequências seleccionado constata-se que os valores de impedância aumentam em concordância com o aumento da concentração de TCS. A solução de água ultra-pura e 1% de metanol foi aquela em que o sensor mediu menores valores de impedância, de seguida a solução de água ultra-pura com 1% de metanol e  $10^{-18}$  M de TCS e assim sucessivamente até à solução de água ultra-pura com 1% de metanol e com  $10^{-9}$  M de TCS, como representado na Figura 4.17. O gráfico de graus de fase impedância (Figura 4.16) apresenta o comportamento inverso. À medida que a concentração de TCS aumenta nas soluções os valores de graus de fase de impedância diminuem. Verifica-se uma boa separação e evolução dos pontos correspondentes às diferentes

concentrações de TCS, quer no espectro de impedância quer no espectro de fase da impedância.

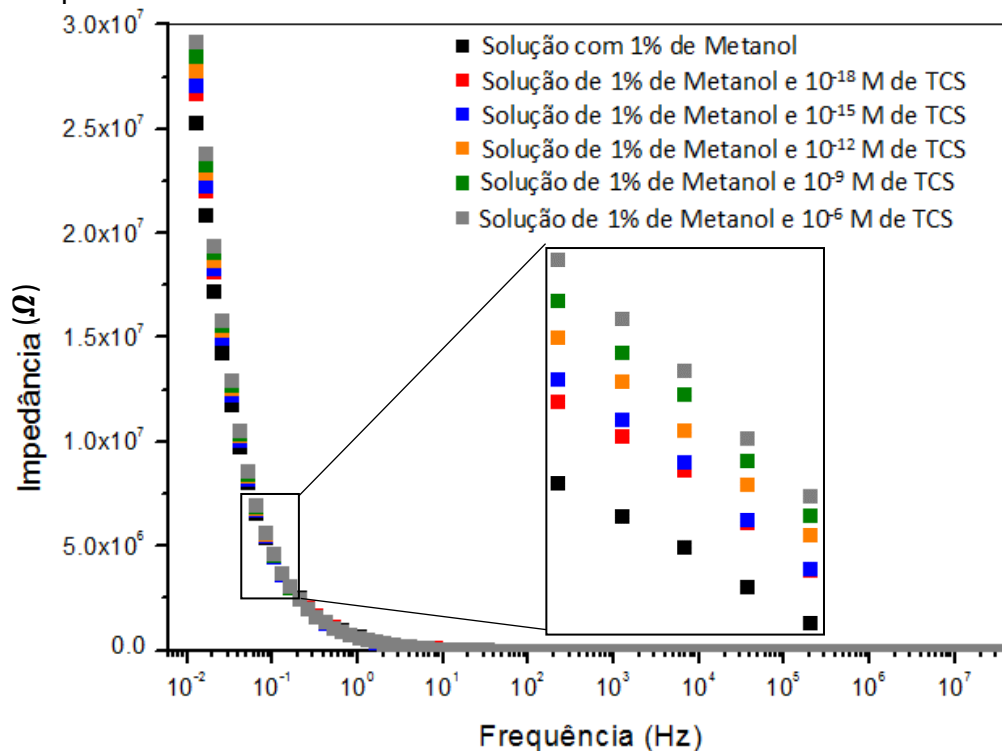


Figura 4.15 Espectro de impedância ( $\Omega$ ) função em da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PEI/PSS em água dopada com TCS

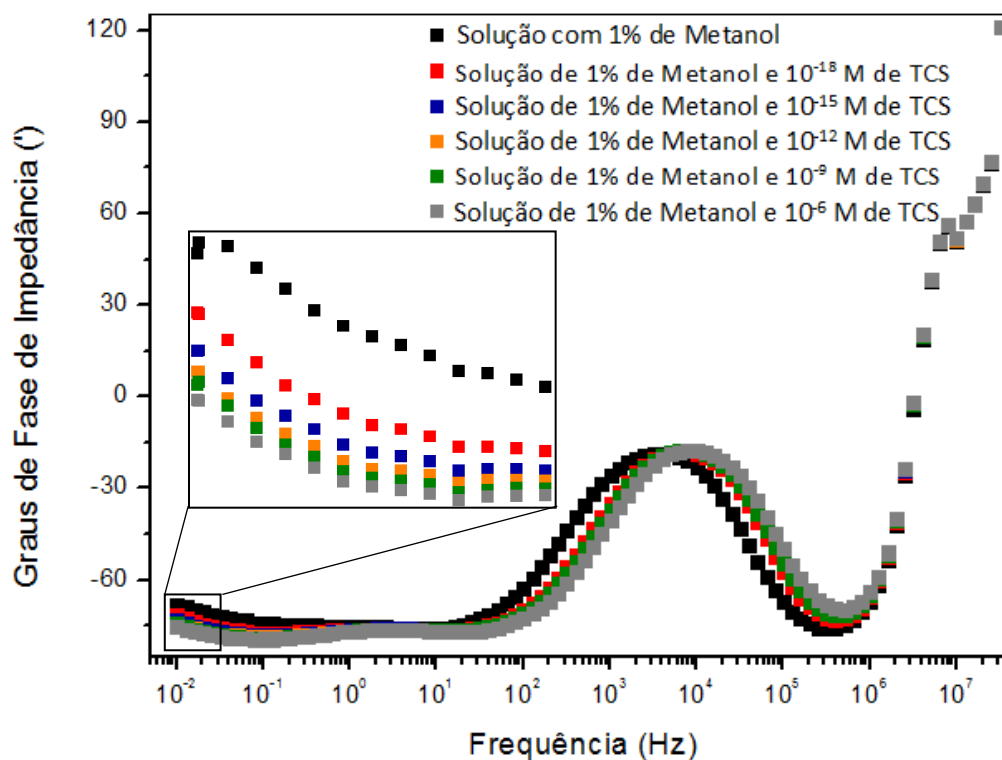


Figura 4.16: Espectro de fase da impedância ( $^\circ$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor revestido com filme PEI/PSS em água dopada com TCS.

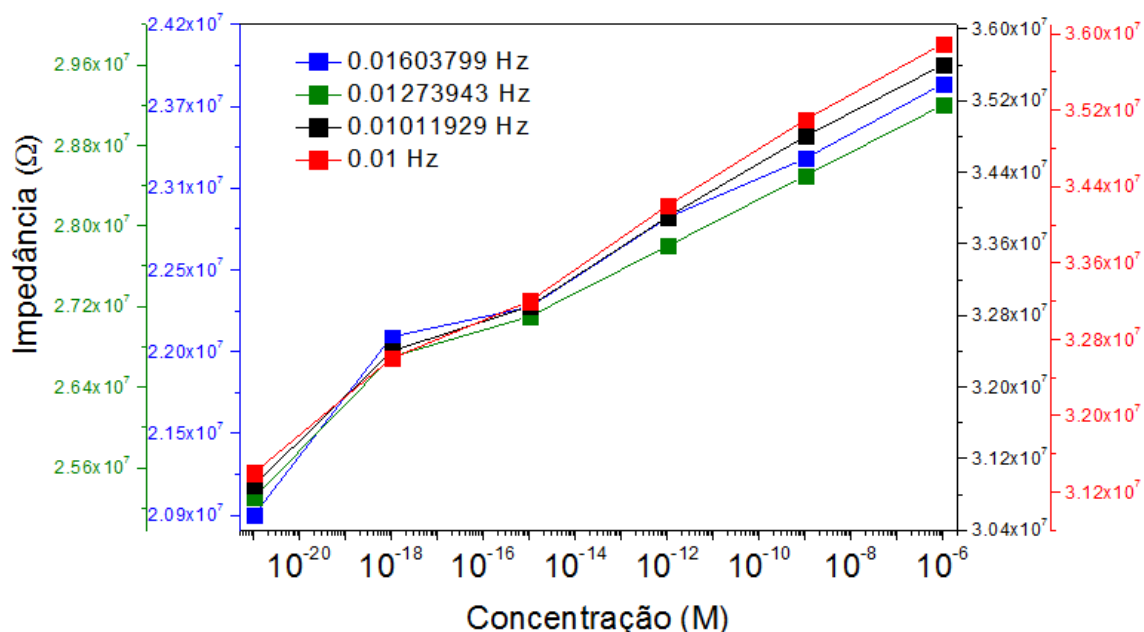


Figura 4.17: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor revestido com filme PEI/PSS em água dopada com TCS para as frequências  $1.604 \times 10^{-2}$ ,  $1.274 \times 10^{-2}$ ,  $1.012 \times 10^{-2}$  e  $10^{-2}$  Hz

Independentemente do filme com que se revestiu o sensor, o comportamento da impedância em função da concentração de TCS é sempre inverso ao comportamento da capacitância em função da concentração de TCS, embora a capacitância só tenha sido aqui representada para um tipo de revestimento.

Analisando todos os espectros em que se fixaram valores de frequência, de forma a analisar a variação da impedância/capacitância em função da concentração, verifica-se que o sensor revestido pelo filme PEI/PSS é o mais eficaz na detecção de moléculas de TCS em água, uma vez que só neste caso foi possível representar todas as concentrações correspondentes às diferentes amostras analisadas. O revestimento do sensor com o filme PEI/PSS tornou a sua capacidade na detecção de TCS muito mais eficaz.

Verificou-se que independentemente da frequência escolhida ocorreu uma diminuição da impedância com o aumento da concentração de TCS. Em todos os gráficos os pontos correspondentes às concentrações  $10^{-27}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-21}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M têm valores muito semelhantes entre si e muito afastados dos pontos correspondentes às concentrações  $10^{-18}$ ,  $10^{-15}$  e  $10^{-12}$  M. Para além de um possível problema da falta de contacto encontrado no conector de ligação dos cabos, este

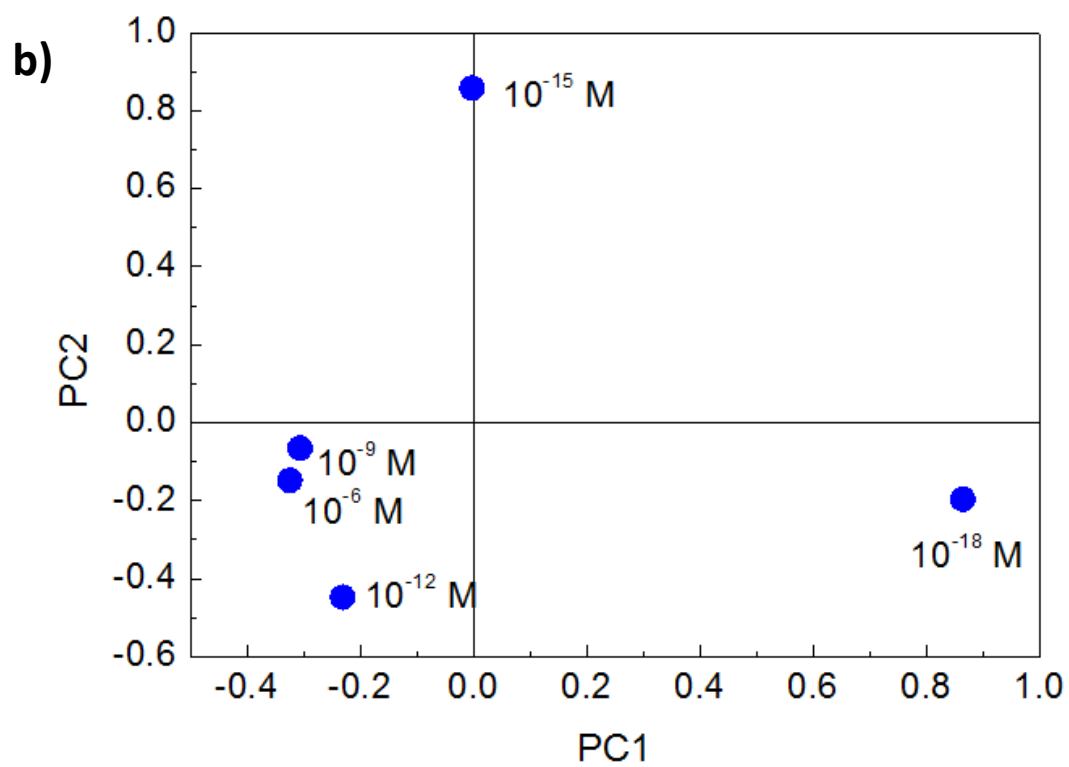
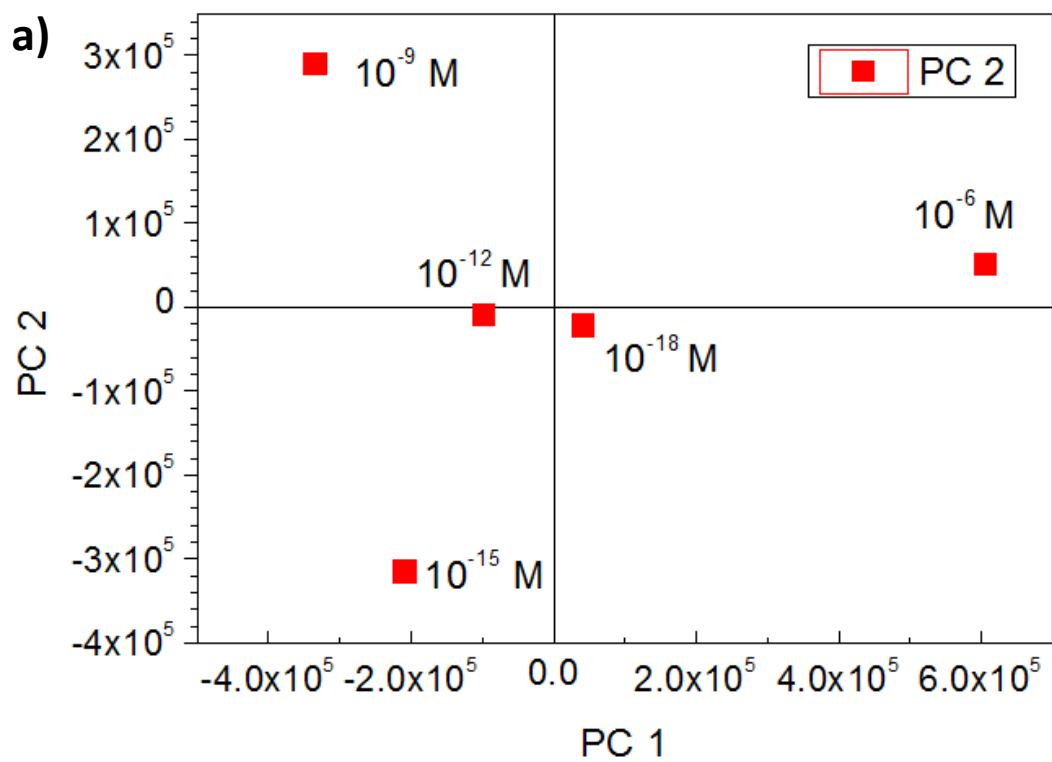


afastamento pode ser explicado, no caso das concentrações  $10^{-27}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-21}$  M, à ausência de TCS no leite e no caso das concentrações  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M à elevada concentração de TCS, que conduziu à saturação do sensor.

Os espectros obtidos revelaram ser reproduzíveis e de um modo geral, as parcelas revelam que todos os sistemas de dispositivos sensores são capazes de distinguir a presença de TCS e são sensíveis à sua concentração. Observe-se que a impedância e a capacitância foram representadas numa escala logarítmica, para enfatizar as mudanças. Pode-se então concluir que todos os dispositivos podem distinguir claramente as concentrações de TCS em praticamente todas as faixas de frequência.

#### **4.2.5 Aplicação de PCA aos dados obtidos com filmes LbL**

Os resultados obtidos com os diferentes filmes finos foram tratados pelo método de PCA. A figura 4.18 a) mostra a representação das componentes principais PC1 e PC2 obtidas pelo método de PCA a partir dos espectros de impedância em função da frequência medidos nos sensores com os elétrodos revestidos pelos filmes LbL, para as concentrações de  $10^{-18}$  M a  $10^{-6}$  M de TCS e que em conjunto explicam 97,13% da variância total dos dados, a variância da PC1 tomou o valor de 71,98% enquanto a PC2 o valor de 25,15%. Este gráfico mostra a distinção entre as diferentes concentrações, mas nenhuma das componentes principais nos dá uma evolução com a concentração de TCS. Estes resultados também indicam que uma escolha otimizada dos sensores pode resultar numa discriminação mais acentuada da concentração de TCS.



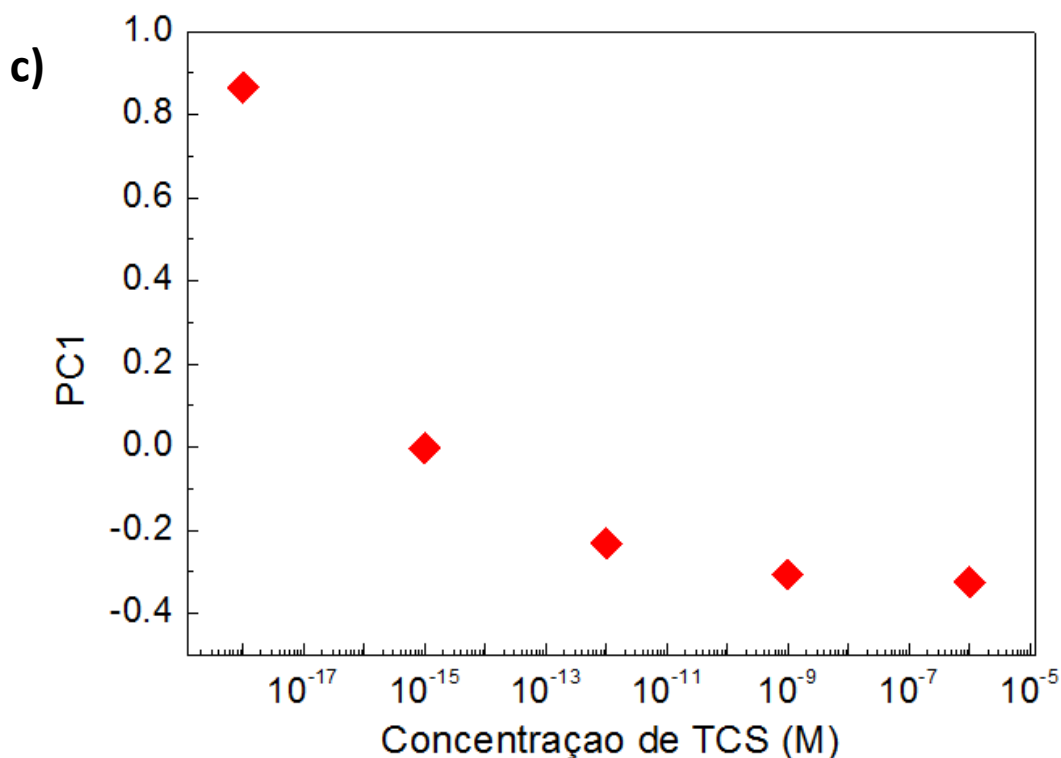


Figura 4.18: a) Representação das componentes principais PC1 e PC2 obtidas pelo método de PCA a partir dos espectros de impedância em função da frequência com o sensor de eléctrodos revestidos pelos filmes LbL, para as concentrações de  $10^{-18}$  M a  $10^{-6}$  M de TCS, que em conjunto explicam 97,13% da variância total dos dados. b) Representação das componentes principais PC1 e PC2 obtidas pelo método de PCA a partir dos espectros de impedância em função da frequência com o sensor de eléctrodos revestidos pelos filmes LbL preparados com PEI/OG, para as concentrações de  $10^{-18}$  M a  $10^{-6}$  M de TCS, em que a componente principal 1 contribui com 99,98% da variância total quando os dados considerados são obtidos com os filmes de PEI/OG. c) Componente principal 1 obtida por PCA em função da concentração de TCS em água a partir dos resultados obtidos em b).

Numa tentativa de se verificar que a escolha dos sensores pode levar a uma boa discriminação, os dados de impedância obtidos com os filmes de PEI/OG foram caracterizados pelo método de PCA, tal como mostra a figura 4.18 b), e os resultados indicaram que a componente principal 1 e que a componente principal 1 contribui agora com 99,98% da variância total. Nestas condições, o valor calculado de PC1 evolui assintoticamente com a concentração de TCS, indicando que o conceito de LE pode ser útil no desenvolvimento de um sensor que permita detectar baixas concentrações de TCS.

### **4.3 Caracterização dos espectros de impedância dos eléctrodos interdigitados sem camadas sensoriais em leite dopado com TCS**

A análise espectral das emulsões de leite com TCS foi efectuada segundo os mesmos procedimentos aplicados às soluções de TCS, com excepção de que neste caso foi usado leite em vez de água ultra-pura. As medições foram feitas, novamente, por ordem ascendente de concentrações, isto é, começou-se por analisar a água ultrapura, de seguida analisou-se o leite, seguido de leite com 1% de metanol e em seguida as emulsões de leite e TCS com concentrações de  $10^{-18}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M. Também neste caso previne-se que uma medição anterior perturbe os resultados da medição seguinte, dado que a quantidade de molécula-alvo que poderá ficar adsorvida no sensor seja menor à quantidade medida em seguida. Entre cada medição o sensor foi lavado cinco vezes com água ultra-pura, cinco vezes com álcool e novamente cinco vezes com água ultra-pura, como descrito no ponto 3.2.2. Para cada amostra foram feitas 3 medições consecutivas, com lavagem do sensor entre medições.

Obtiveram-se os espectros de impedância e de tangente do grau de fase de impedância ( $Tg(\delta)$ ) em função da frequência que podem ser observados, nas Figuras 4.19 e 4.20, respectivamente.

Analizando o espectro da impedância em função da frequência (Figura 4.19) em comparação com o espectro obtido para o mesmo sensor, mas em soluções aquosas (Figura 4.1), constata-se que em ambos os casos a concentração de TCS que se afastou mais do esperado foi a de  $10^{-18}$  M, que no gráfico da Figura 4.1 não está representada. Em relação às outras concentrações de TCS, é possível observar, no intervalo de frequências evidenciado, que a impedância aumenta progressivamente com o aumento da concentração de TCS no leite.

No gráfico da Figura 4.20 verifica-se que o mínimo da  $Tg(\delta)$  diminui progressivamente com o aumento da concentração de TCS no leite, à excepção da amostra de concentração  $10^{-6}$  M para a qual se esperavam valores de  $Tg(\delta)$  menores que os obtidos.

O facto de ter sido substituída a água por leite não alterou de forma muito significativa os resultados obtidos, pelo menos para os espectros de impedância. Comprova-se que mesmo em leite o sensor com eléctrodos interdigitados sem qualquer revestimento continua a detectar a presença de TCS em diferentes concentrações.

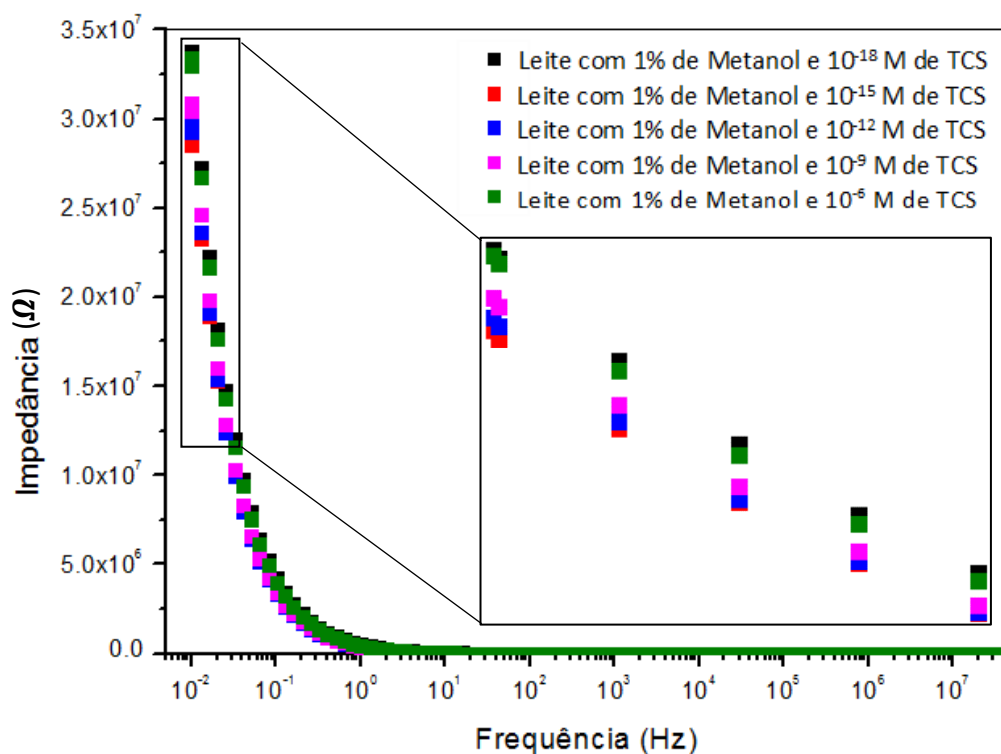


Figura 4.19: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor sem revestimento em leite dopado com TCS

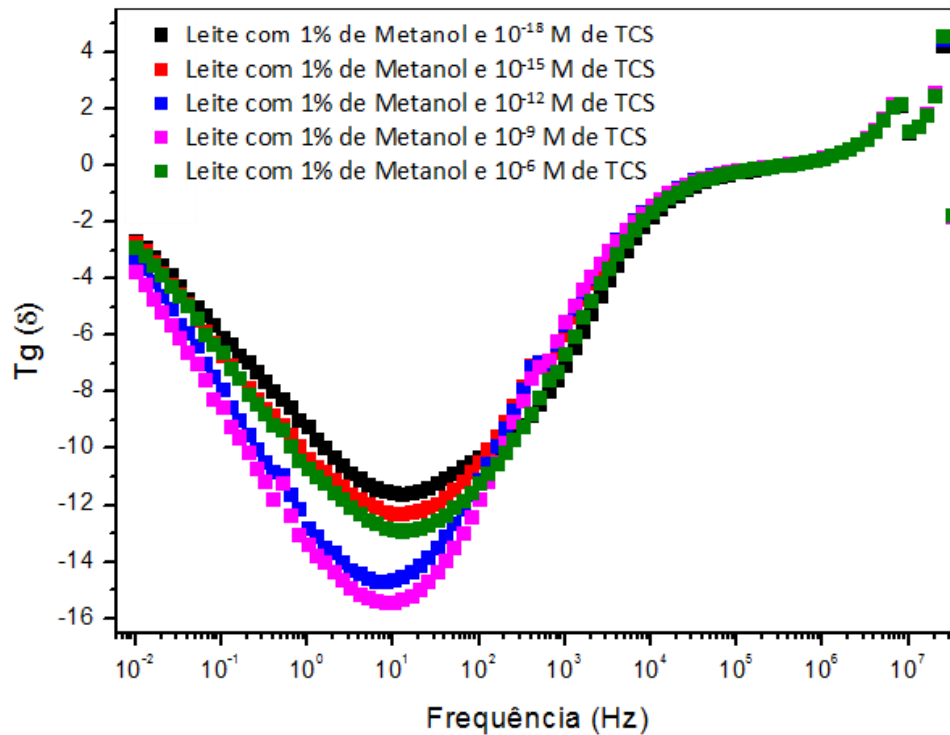


Figura 4.20: Espectro da tangente do grau de fase de impedância em função da frequência (Hz) obtido com um sensor sem revestimento em leite dopado com TCS

Para um valor de frequência fixo ( $2.542 \times 10^7$  Hz) obtiveram-se os espectros de impedância (Figura 4.21) e de  $Tg(\delta)$  (Figura 4.22) em função da concentração de TCS, ambos para as 3 medições realizadas.

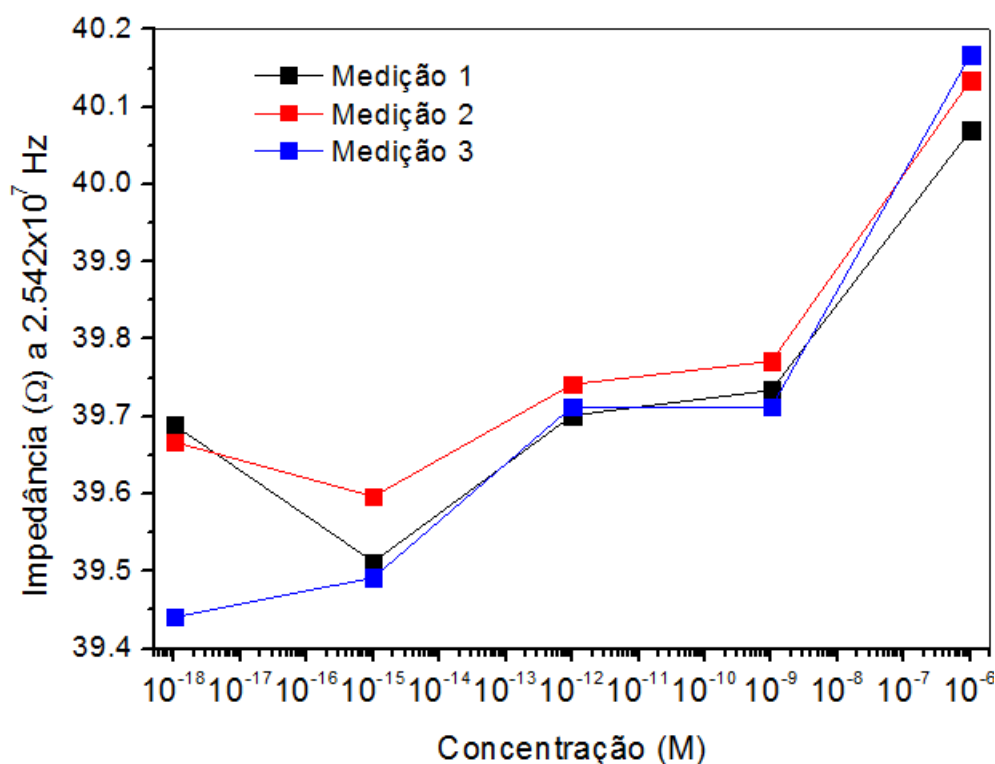


Figura 4.21: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor sem revestimento em leite dopado com TCS para uma frequência de  $2.542 \times 10^7$  Hz

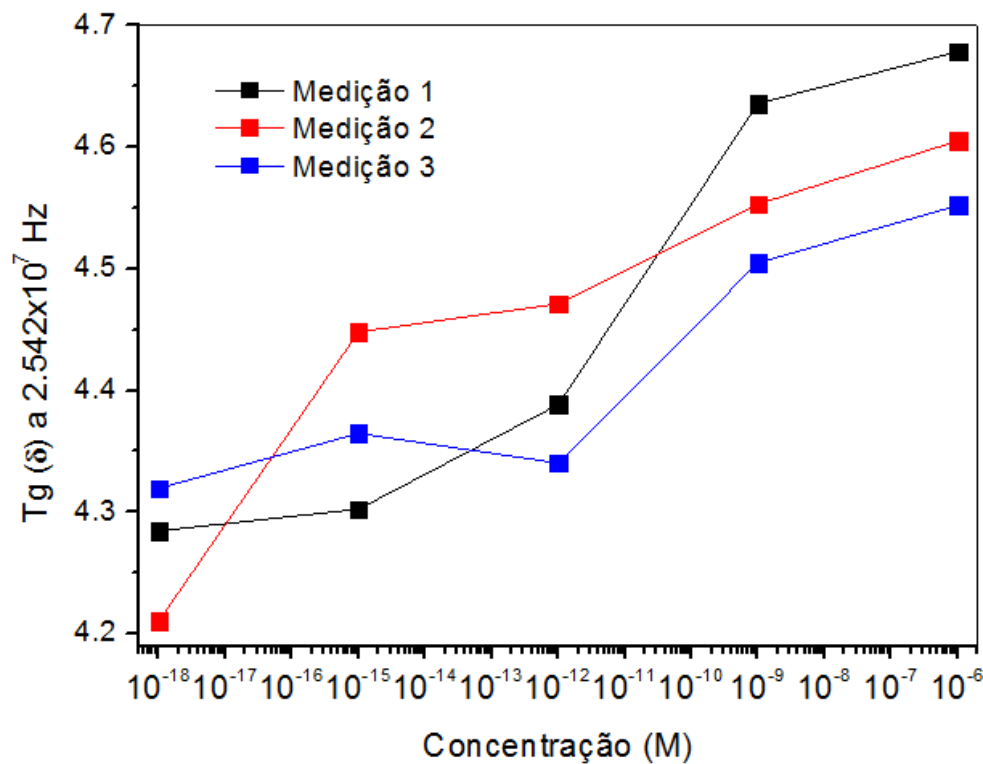


Figura 4.22: Espectro da tangente do grau de fase de impedância em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor sem revestimento em leite dopado com TCS para uma frequência de  $2.542 \times 10^7$  Hz

Como se pode constatar para a frequência em análise os valores de impedância aumentam com o aumento da concentração de TCS, à exceção da concentração de  $10^{-18}$  M que para as medições 1 e 2 apresenta valores de impedância maiores do que a amostra de concentração  $10^{-15}$  M.

Comparando com o espectro obtido para soluções aquosas utilizando o mesmo sensor (Figura 4.3) verifica-se que em soluções aquosas a evolução da impedância com o aumento de TCS apresenta um comportamento mais linear do que o observado no espectro representado na Figura 4.21. Essas diferenças são perfeitamente aceitáveis, uma vez que o leite, embora seja uma emulsão homogênea, tem uma grande e variada quantidade de moléculas dissolvidas.

Também os valores de  $Tg(\delta)$  (Figura 4.22), para a frequência em análise, aumentam progressivamente com o aumento da concentração de TCS, à exceção da concentração  $10^{-12}$  M para a medição 3, que decresceu em relação à amostra menos concentrada medida anteriormente ( $10^{-15}$  M).

Posteriormente fez-se a representação das componentes principais PC1 e PC2 a partir dos espectros de capacitância em função da frequência para o sensor com os eléctrodos sem nenhum filme depositado, bem como a representação da componente principal 1 em função da concentração de TCS em leite, como se pode observar na Figura 4.23.



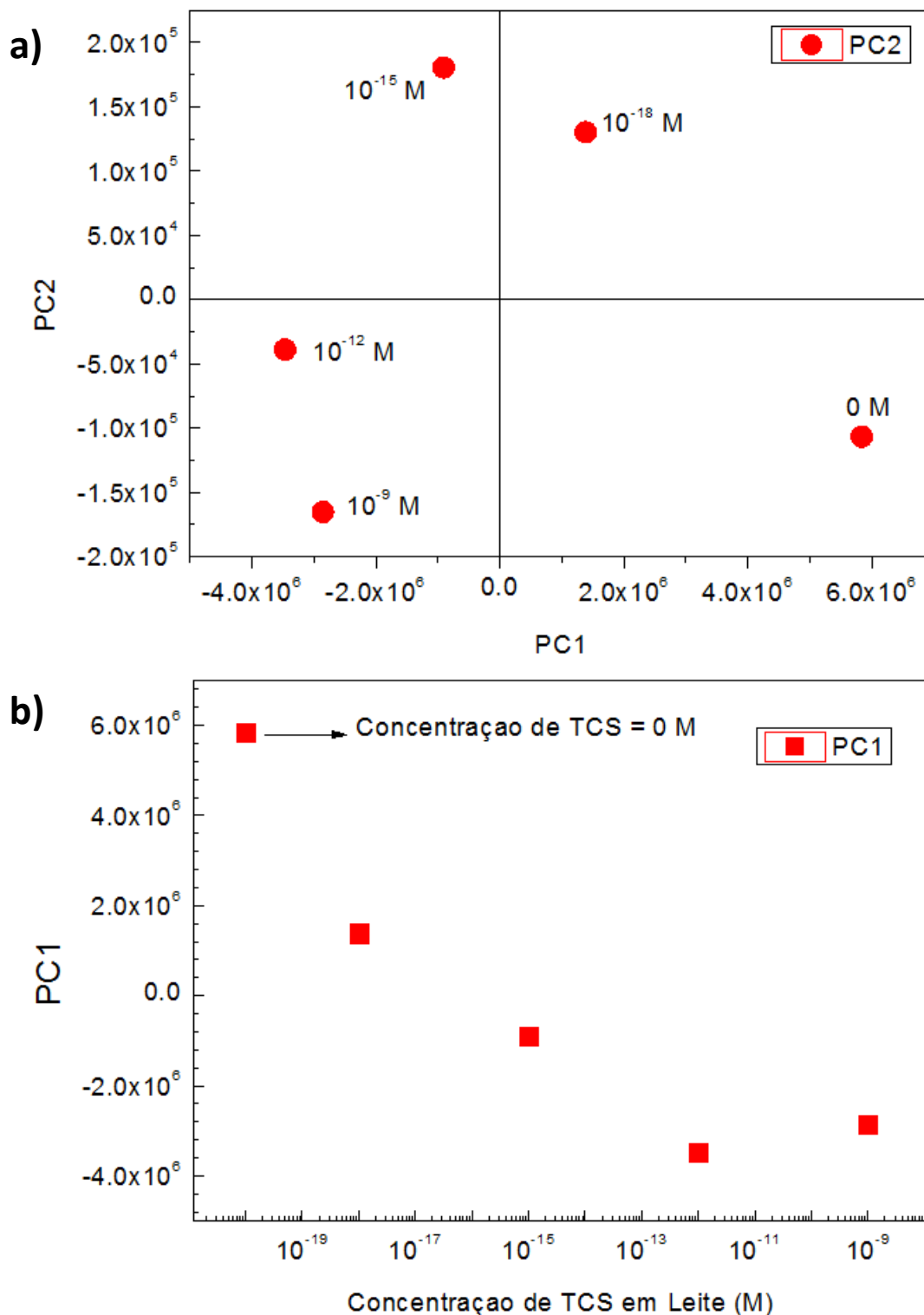


Figura 4.23: a) Representação das componentes principais PC1 e PC2 obtidas pelo método de PCA a partir dos espectros de capacitância em função da frequência para o sensor com os eléctrodos sem nenhum filme depositado, para as concentrações de 0 M a  $10^{-9}$  M de TCS, que em conjunto explicam 99,83% da variância total dos dados. b) Componente principal 1 obtida por PCA em função da concentração de TCS em leite. Estes resultados foram obtidos a partir dos espectros de capacitância em função da frequência.

#### 4.4 Caracterização dos espectros de impedância dos eléctrodos interdigitados revestidos pela técnica de impressão molecular em leite dopado com TCS

A análise espectral realizada com o sensor revestido por MIPs em emulsões de leite com TCS dissolvido foi realizada seguindo os mesmos procedimentos aplicados no ponto 4.3, à excepção do sensor, que neste caso foram revestidos os eléctrodos interdigitados. As concentrações de TCS usadas foram as mesmas e as medições foram feitas pela mesma ordem, com lavagem do sensor apenas com água ultra-pura entre cada medição. De forma a proteger o revestimento do sensor, não foi usado álcool na lavagem deste entre cada medição.

Os espectros obtidos de impedância e de  $Tg(\delta)$  em função da frequência encontram-se representados nas Figuras 4.24 e 4.25.

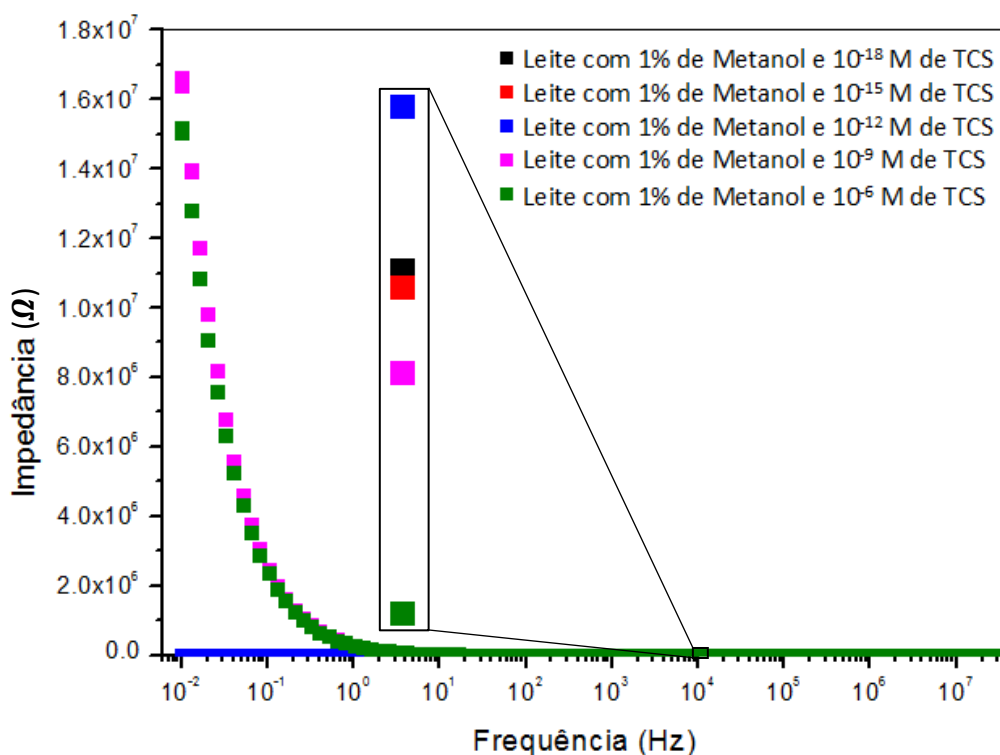


Figura 4.24: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da frequência (Hz) obtido com um sensor de eléctrodos revestidos com MIPs em leite dopado com TCS

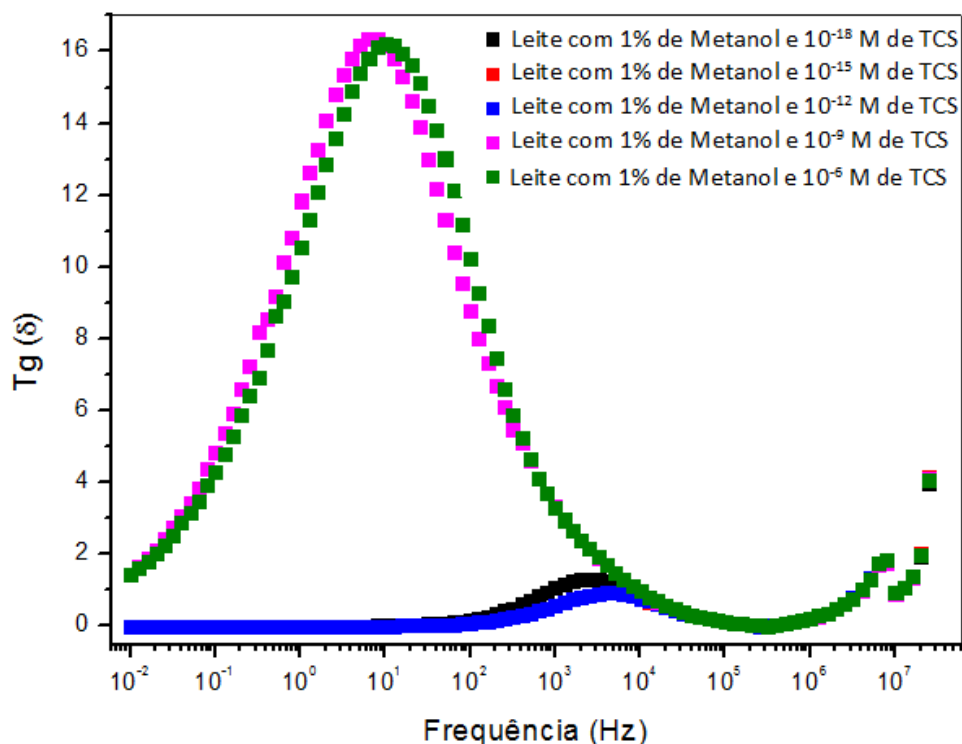


Figura 4.25: Espectro da tangente do grau de fase de impedância em função da frequência (Hz) obtido com um sensor de eléctrodos revestidos com MIPs em leite dopado com TCS

No espectro representado na Figura 4.24 constata-se que as curvas correspondentes às concentrações de TCS de  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M são muito semelhantes às obtidas com o sensor sem qualquer revestimento para as mesmas emulsões (Figura 4.19), com uma pequena diminuição dos valores de impedância. Por outro lado, as curvas correspondentes às concentrações  $10^{-18}$ ,  $10^{-15}$  e  $10^{-12}$  M apresentam valores de impedância completamente diferentes, várias ordens de grandeza inferiores, entre as frequências  $10^{-2}$  a 1 Hz. Para o intervalo de frequências evidenciado, na ordem dos  $10^4$  Hz, observa-se uma diminuição da impedância com o aumento da concentração de TCS, com excepção da concentração de  $10^{-12}$  M, que apresenta valores de impedância superiores a todas as concentrações analisadas.

Também no espectro de  $Tg(\delta)$  representado na Figura 4.25 há um claro afastamento das curvas correspondentes às concentrações de TCS  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M em relação às restantes concentrações, não sendo evidente que tipo de relação existe entre a  $Tg(\delta)$  e a concentração de TCS. Não é possível estabelecer uma

comparação com o espectro obtido na secção 4.3 (Figura 4.20), uma vez que a evolução dos valores da  $Tg(\delta)$  com o aumento da frequência são completamente diferentes.

Por último, fixaram-se quatro valores de frequência para os quais se representaram os espectros de impedância e de  $Tg(\delta)$  em função da concentração de TCS, tal como é observado nas Figuras 2.26 e 2.27, respectivamente.

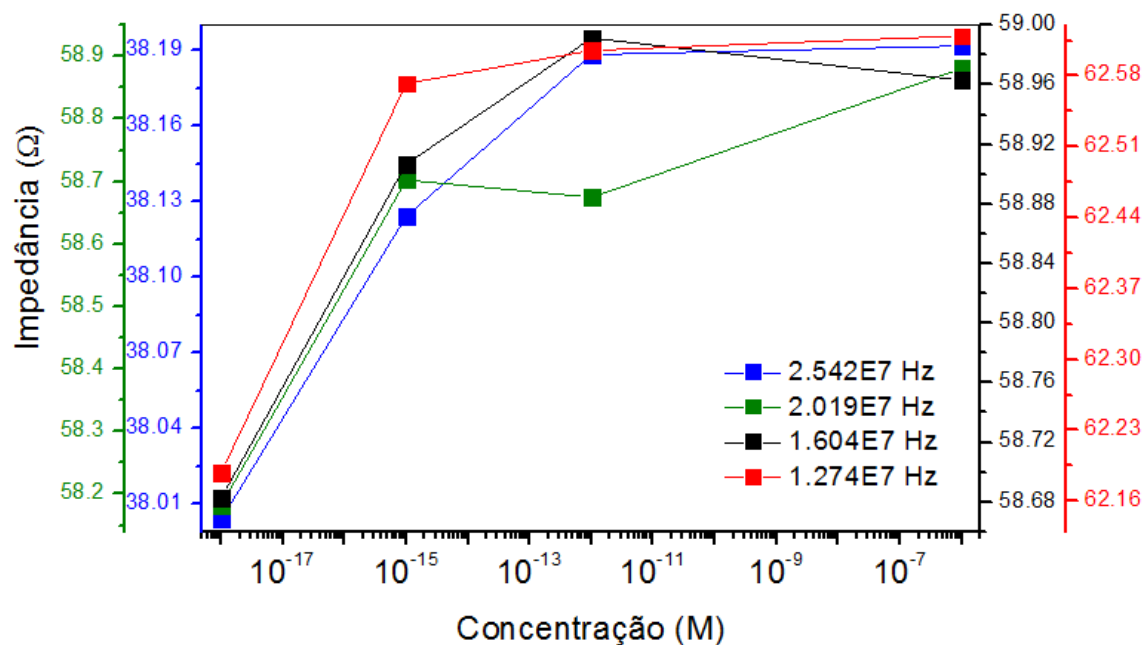


Figura 4.26: Espectro de impedância ( $\Omega$ ) em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor de eléctrodos revestidos com MIPs em leite dopado com TCS para as frequências  $1.274 \times 10^7$ ,  $1.604 \times 10^7$ ,  $2.019 \times 10^7$  e  $2.542 \times 10^7$  Hz

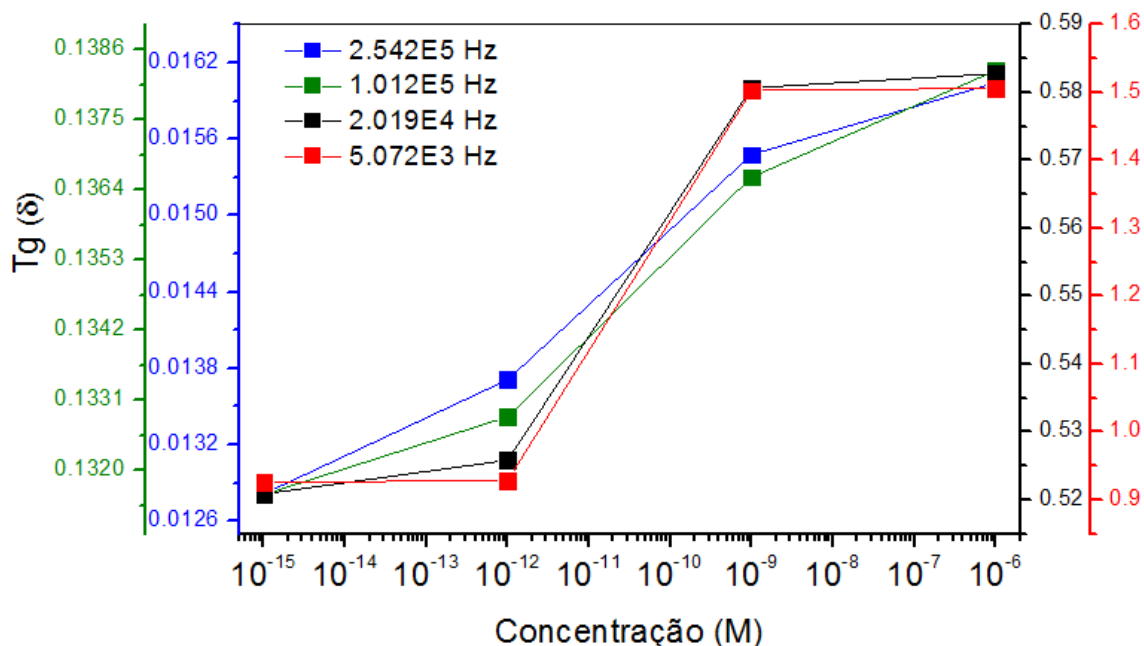


Figura 4.27: Espectro da tangente do grau de fase de impedância em função da concentração de TCS (M) obtido com um sensor de eléctrodos revestidos com MIPs em leite dopado com TCS para as frequências  $5.072 \times 10^3$ ,  $2.019 \times 10^4$ ,  $1.012 \times 10^5$  e  $2.542 \times 10^5$  Hz

No gráfico representado na Figuras 4.26 verificou-se que, para as frequências em análise, a impedância aumenta à medida que a concentração de TCS aumenta, sendo esse aumento muito mais acentuado quando se aumenta a concentração de TCS de  $10^{-18}$  para  $10^{-15}$  M. Para concentrações mais elevadas o aumento da impedância é quase imperceptível, verificando-se uma diminuição, para todas as frequências, quando se aumenta a concentração de TCS de  $10^{-9}$  (não representada na Figura 4.26) para  $10^{-6}$  M. Conclui-se que para concentrações mais elevadas o sistema sensorial concebido através da técnica de impressão molecular atinge a saturação, não sendo possível a detecção de TCS a partir de concentrações da ordem dos  $10^{-12}$  M. A técnica de impressão superficial usada para revestir os sensores permite a formação, na superfície do substrato, de locais de reconhecimento de alta afinidade às moléculas de TCS. Quando estes locais estão todos preenchidos pelas moléculas de TCS, o sensor deixa de ser eficiente e a sua capacidade de detecção é muito baixa, chegando a um ponto de saturação em que já nem sequer se há detecção.

O espectro da  $Tg(\delta)$  em função da concentração de TCS (Figura 4.27) apresenta uma evolução mais coerente que o espectro de impedância. O aumento

da concentração de TCS traduz-se num aumento progressivo da  $Tg(\delta)$ , obtendo-se melhores resultados para frequências maiores. Neste caso, o aumento da  $Tg(\delta)$  é mais significativo quando se aumenta a concentração de TCS de  $10^{-12}$  M para  $10^{-9}$  M, voltando a ser menos acentuado da concentração de  $10^{-9}$  para  $10^{-6}$  M, tal como se verificou para o caso da impedância.

A detecção de TCS em leite usando um sensor revestido pela técnica MIPs não se reflectiu numa melhoria significativa em relação às medições feitas com o sensor sem qualquer revestimento para as mesmas amostras. Nos sensores revestidos com filmes pela técnica de pulverização provou-se que o filme de PEI/PSS é o mais eficaz na detecção de TCS. No futuro, seria interessante adaptar este revestimento de forma a poder ser usado em medições no leite, uma vez que só foi testado em soluções de água ultra-pura.



## Conclusão e Perspectivas Futuras

Esta dissertação descreve o trabalho de investigação realizado no âmbito do desenvolvimento de um sensor de TCS em leite materno, usando o conceito de língua electrónica e, portanto, usando um conjunto de sensores com camadas sensoriais obtidas pela técnica LbL, por pulverização, e por impressão molecular de polímeros (MIPs).

Concluiu-se que os sensores com camadas sensoriais obtidos pela técnica LbL por pulverização são mais eficazes na detecção das moléculas de TCS do que o sensor simples sem qualquer revestimento em água. Ficou provada para ambos os tipos de sensor, com e sem revestimento dos eléctrodos, a capacidade de detecção de diferentes concentrações de TCS e a melhoria na eficácia de detecção com o revestimento dos eléctrodos interdigitados através da técnica LbL.

Em relação às medições realizadas nas amostras de leite provou-se a capacidade de detecção de TCS em diferentes concentrações quer com sensores de eléctrodos interdigitados sem qualquer revestimento quer com sensores de eléctrodos interdigitados revestidos por MIPs, embora no segundo caso não tenha sido evidente a melhoria da capacidade do sensor na detecção de moléculas de TCS. Contudo, dada a reprodutibilidades dos dados, a capacidade de detecção de diferentes concentrações de TCS em leite ficou comprovada para ambos os tipos de sensores usados (com e sem revestimento).



No caso das medições realizadas com eléctrodos interdigitados revestidos pela técnica de impressão molecular, o facto de não ter sido verificada uma melhoria significativa dos resultados poderá residir nas emulsões preparadas, por exemplo, devido a contaminação por alguma substância indesejada, presente nos materiais usados; por mau contacto no conector de ligação dos cabos; ou por anomalias no revestimento.

Em estudos futuros devem ser contempladas medições em soluções aquosas com o sensor revestido por MIPs, de forma a ser possível estabelecer uma comparação entre as medições em água e em leite. Medições em leite só devem ser feitas depois de ser comprovada a reprodutibilidade nos dados e a melhoria na capacidade de detecção do sensor em soluções aquosas com diferentes concentrações de TCS. Neste estudo, devido à falta de tempo não foi possível seguir o procedimento que agora se recomenda, uma vez que grande parte do tempo foi despendida em tentativas na produção do polímero MAGA.

## Referências

- [1] N. Atar, T. Eren, M. L. Yola, and S. Wang, "A sensitive molecular imprinted surface plasmon resonance nanosensor for selective determination of trace triclosan in wastewater," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 216, pp. 638–644, 2015.
- [2] I. Marques, "Desenvolvimento de um Sensor de Triclosan em meio aquoso complexo," Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2016.
- [3] E. P. Hines, P. Mendola, O. S. von Ehrenstein, X. Ye, A. M. Calafat, and S. E. Fenton, "Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women," *Reprod. Toxicol.*, vol. 54, pp. 120–128, 2015.
- [4] M.-F. Yueh and R. H. Tukey, "Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 56, pp. 251–72, 2016.
- [5] M. O. James, W. Li, D. P. Summerlot, L. Rowland-Faux, and C. E. Wood, "Triclosan is a potent inhibitor of estradiol and estrone sulfonation in sheep placenta," *Environ. Int.*, vol. 36, no. 8, pp. 942–949, 2010.
- [6] N. T. and P. D. D. R. H. Gee, A. Charles, "Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 28, pp. 78–91, 2008.
- [7] Y. Liu, Q. J. Song, and L. Wang, "Development and characterization of an amperometric sensor for triclosan detection based on electropolymerized

- molecularly imprinted polymer," *Microchem. J.*, vol. 91, no. 2, pp. 222–226, 2009.
- [8] J. Yang, P. Wang, X. Zhang, and K. Wu, "Electrochemical sensor for rapid detection of triclosan using a multiwall carbon nanotube film," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 20, pp. 9403–9407, 2009.
  - [9] K. Toko, "RETRACTED: Electronic tongue," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 13, no. 6, pp. 701–709, 1998.
  - [10] M. Adolfsson-Erici, M. Pettersson, J. Parkkonen, and J. Sturve, "Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden," *Chemosphere*, vol. 46, no. 9–10, pp. 1485–1489, 2002.
  - [11] L.-H. Wang and S.-C. Chu, "Voltammetric Detector for Liquid Chromatography: Determination of Triclosan in Rabbit Urine and Serum," *Chromatographia*, vol. 60, no. 7, pp. 385–390, 2004.
  - [12] A. B. Dann and A. Hontela, "Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 31, no. 4, pp. 285–311, 2011.
  - [13] T. E. Arbuckle *et al.*, "Maternal and infant exposure to environmental phenols as measured in multiple biological matrices," *Sci. Total Environ.*, vol. 508, pp. 575–584, 2015.
  - [14] H. Ma *et al.*, "Triclosan reduces the levels of global DNA methylation in HepG2 cells," *Chemosphere*, vol. 90, no. 3, pp. 1023–1029, 2013.
  - [15] A. Binelli, D. Cogni, M. Parolini, C. Riva, and A. Provini, "In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes," *Aquat. Toxicol.*, vol. 91, no. 3, pp. 238–244, 2009.
  - [16] T. Winitthana, S. Lawanprasert, and P. Chanvorachote, "Triclosan Potentiates Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Anoikis-Resistant Human Lung Cancer Cells," *PLOS ONE*, 2014. .
  - [17] M.-F. Yueh *et al.*, "The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 48, pp. 17200–17205, 2015.
  - [18] H. R. Lee, K. A. Hwang, K. H. Nam, H. C. Kim, and K. C. Choi, "Progression of breast cancer cells was enhanced by endocrine-disrupting chemicals, triclosan and octylphenol, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway in cellular and mouse xenograft models," *Chem. Res.*

- Toxicol.*, vol. 27, no. 5, pp. 834–842, 2014.
- [19] I. Tamura *et al.*, “Triclosan, an antibacterial agent, increases intracellular Zn(2+) concentration in rat thymocytes: its relation to oxidative stress,” *Chemosphere*, vol. 86, no. 1, pp. 70–5, 2012.
  - [20] M. T. Dinwiddie, P. D. Terry, and J. Chen, “Recent evidence regarding triclosan and cancer risk,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 11, no. 2, pp. 2209–2217, 2014.
  - [21] K. B. Paul, J. M. Hedge, M. J. DeVito, and K. M. Crofton, “Developmental triclosan exposure decreases maternal and neonatal thyroxine in rats,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, no. 12, pp. 2840–2844, 2010.
  - [22] K. B. Paul, J. M. Hedge, M. J. Devito, and K. M. Crofton, “Short-term exposure to triclosan decreases thyroxine in vivo via upregulation of hepatic catabolism in young long-evans rats,” *Toxicol. Sci.*, vol. 113, no. 2, pp. 367–379, 2009.
  - [23] B. K. Park, E. L. T. Gonzales, S. M. Yang, M. Bang, C. S. Choi, and C. Y. Shin, “Effects of triclosan on neural stem cell viability and survival,” *Biomol. Ther.*, vol. 24, no. 1, pp. 99–107, 2016.
  - [24] G. Ertürk and B. Mattiasson, “Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors,” *Sensors*, vol. 17, no. 2, p. 288, 2017.
  - [25] G. Odian, *Principles of Polymerization*, Fourth. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
  - [26] R. Pedro, F. Lopes, and D. F. Pimentel, “Desenvolvimento de um Sensor de Ibuprofeno em meio aquoso,” 2014.
  - [27] C. de F. F. Pires, “Desenvolvimento de uma Língua Eletrônica para avaliar a qualidade de azeite,” 2016.
  - [28] E. Barsoukov and J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy*. 2005.
  - [29] A. R. M. Timóteo, J. H. F. Ribeiro, P. A. Ribeiro, and M. Raposo, “Dynamics of creation photoinduced birefringence on (PAH/PAZO)<sub>n</sub> layer-by-layer films: Analysis of consecutive cycles,” *Opt. Mater. (Amst.)*, vol. 51, pp. 18–23, 2016.
  - [30] “2-Hydroxyethyl methacrylate 98% \_ Sigma-Aldrich.” .
  - [31] T. Kuilla, S. Bhadra, D. H. Yao, N. H. Kim, S. Bose, and J. H. Lee, “Recent advances in graphene based polymer composites,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 11, pp. 1350–1375, 2010.
  - [32] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, “The chemistry of

- graphene oxide," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 228–240, 2010.
- [33] P. I. Custódio, "Desenvolvimento de heterojunções híbridas nanoestruturadas para aplicação em células solares," 2016.
  - [34] "Sodium phosphate," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2006, no. 1, p. pdb.rec8303, Jun. 2006.
  - [35] P. Rajendran, E. Ho, D. E. Williams, and R. H. Dashwood, "Dietary phytochemicals , HDAC inhibition , and DNA damage / repair defects in cancer cells," pp. 1–23, 2011.
  - [36] J.-P. Schirmann and P. Bourdauducq, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
  - [37] J. Montheard, M. Chatzopoulos, and D. Chappard, "2-Hydroxyethyl Methacrylate ( HEMA ): Chemical Properties and Applications in Biomedical," *J. Macromol. Sci. Part C*, pp. 37–41, 2013.
  - [38] "Ethylene glycol dimethacrylate 98%, contains 90-110 ppm monomethyl ether hydroquinone as inhibitor \_ Sigma-Aldrich." .
  - [39] R. M. Silverstein, F. X. Webster, and D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Seventh. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005.